

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. September 2003 (25.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/078468 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 16/00**,
A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00890

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. März 2003 (13.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 12 108.7 13. März 2002 (13.03.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **TEGENERO AG** [DE/DE]; Science Park Würzburg,
Friedrich-Bergius-Ring 15, 97078 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HUENIG, Thomas**
[DE/DE]; Mittlere Heerbergst. 26, 97076 Würzburg
(DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lüke
& Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** USE OF AN ACTIVE SUBSTANCE THAT BINDS TO CD28 FOR PRODUCING A PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) **Bezeichnung:** VERWENDUNG EINER AN CD28 BINDENDEN WIRKSUBSTANZ ZUR HERSTELLUNG EINER PHARMAZEUTISCHEN ZUSAMMENSETZUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of a superagonistic CD28-specific monoclonal antibody (mAb) or a mimic compound of the same, for producing a pharmaceutical composition for the induction and/or reproduction of regulatory T-cells.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpers (mAb) oder einer Mimikriverbindung hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Induktion und/oder Vermehrung regulatorischer T-Zellen.



WO 03/078468 A2

Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

5 Gebiet der Erfindung.

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

10

Definitionen.

Als monoklonale Antikörper (mAb) sind Antikörper
15 bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die typischerweise durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind.

20

Die Aminosäuresequenz von Human CD28 ist unter der Accession No. NM_006139 bekannt.

Das C'-D Loop von CD28 umfaßt die Aminosäuren 52 bis
25 66 der vorstehenden CD28 Sequenz (zur Numerierung siehe auch Ostrov, D.A., et al.; Science (2000), 290:816-819). Unter dem Begriff des C'-D Loops sollen im Folgenden auch beliebige Teilsequenzen hieraus verstanden sein.

30

Ein Loop bzw. eine darin angeordnete Bindungsstelle ist frei zugänglich, wenn für einen definierten Bindungspartner für die Bindungsstelle im Loop keine

sterische Hinderung durch an das Loop anschließende Sequenzen oder Moleküle vorliegt.

Regulatorische T-Zellen sind CD4+ T-Zellen, welche in
5 Mischung mit naiven CD4+ T-Zellen deren Aktivierung inhibieren. Hierzu gehören insbesondere CD4+CD25+ T-Zellen. Ein weiteres Merkmal regulatorischer T-Zellen ist eine vergleichsweise zu anderen T-Zellen niedrige Expression der hochmolekularen Isoformen von CD45 (human: RA). Für
10 regulatorische T-Zellen ist die konstitutive Expression von CD152 typisch. CD4+CD8-SP Thymocyten sind eine der wesentlichen Quellen für regulatorische T-Zellen. Für eine weitergehende Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen wird auf die Literaturstelle K.J. Maloy et
15 al., Nature Immunology, Vol. 2, No. 9, Seiten 816 ff., 2001, verwiesen.

Mit Induktion regulatorischer T-Zellen ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens,
20 Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die Zellteilung (Proliferation) auf einen äußeren Reiz hin bezeichnet. Im Ergebnis liegen nach der Induktion mehr regulatorische T-Zellen vor als vorher.

25 Homologie bezeichnet eine zumindest 70%ige, vorzugsweise zumindest 80%ige, höchstvorzugsweise zumindest 90%ige Sequenzidentität auf Proteinebene, wobei ein homologes Protein oder Peptid einen definierten Bindungspartner mit zumindest gleicher Affinität bindet.
30 det. Abweichungen in der Sequenz können Deletionen, Substitutionen, Insertionen und Elongationen sein.

Eine Mimikriverbindung ist eine natürliche oder synthetische chemische Struktur, die sich in einem definierten Bindungsassay wie ein definierter mAb verhält, welchen die Mimikriverbindung mimikriert.

5

Der Begriff der mAb umfaßt neben Strukturen des üblichen Fab/Fc Aufbaus auch Strukturen, die ausschließlich aus dem Fab-Fragment bestehen. Es ist auch möglich, lediglich die variable Region zu nutzen, wobei das Fragment der schweren Ketten mit dem Fragment der leichten Kette auf geeignete Weise, beispielsweise auch mittels synthetischer Brückenmoleküle, so verbunden ist, daß die Bindungsregionen der Ketten das Antikörperepitop bilden. Der Begriff der Antikörper umfaßt auch (ggf. vollständige) chimäre sowie humanisierte Antikörper.

Superagonistische Stimulation der Proliferation von CD 28 spezifischen T-Zellen meint, daß keine Costimulation, i.e. kein weiteres Bindungsereignis neben einer Bindung eines mAb oder einer Mimikriverbindung an CD28 zur Stimulation oder Inhibierung der Proliferation erforderlich ist.

25 Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung

von Antigenen, z.B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie 2. des auf allen ruhenden T-Zellen mit Ausnahme einer Untergruppe der CD8 T-Zellen des Menschen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches 5 natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der Costimulation der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des 10 CD28-Moleküls mit geeigneten mAbs. Im klassischen System der Costimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des 15 Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Dagegen sind auch CD28-spezifische mAbs bekannt, die ohne Costimulation die T-Zellproliferation einleiten können. Eine solche superagonistische, d. h. von der Besetzung des 20 Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische mAb ist aus der Literaturstelle Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247 bekannt. Demnach wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit 25 unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: costimulatorische mAb, die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors costimulieren; und superagonistische mAb, die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten 30 aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte mAb rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre

...jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete
unterschiedliche Selektionen erhältlich.

Aus der Literaturstelle DE-197 22 888 ist es bekannt, daß
5 superagonistische mAb in der Lage sind, eine Immunde-
viation TH1 zu TH2 zu bewirken und sich insofern zum
Einsatz gegen die Adjuvans Arthritis eignen. TH1 und TH2
Zellen sind CD4 exprimierende T-Zellen. TH1 Zellen werden
auch pro-inflammatorische T-Helfer-Zellen genannt und
10 sezernieren die Cytokine IL-2, TNF und IFN- γ . TH2 Zellen
unterstützen die Aktivierung von B-Zellen und sezernieren
die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10. Dabei wird die
Differenzierung von CD4 T-Zellen zu den vorstehenden
funktional unterschiedlichen Untergruppen nicht nur durch
15 die verfügbaren Cytokine kontrolliert, sondern sie wird
auch durch Costimulation über CD28 moduliert.
CD28-defiziente Mäuse zeigen normale TH1 aber reduzierte
TH2 abhängige Antworten und das Cytokinprofil von
TCR-transgenen CD4 Zellen wird durch CD28 Ligation in
20 Richtung TH2 verschoben. Dagegen verhindert ein starkes
TCR Signal CD28 vermittelte TH2 Differenzierung.

Aus der in der Literaturstelle K.J. Maloy et al., Nature
Immunology, Vo. 2, No. 9, Seiten 816 ff., 2001,
25 zusammengefaßten Primärliteratur ist bekannt, daß
regulatorische T-Zellen bei Autoimmunreaktionen wichtig
sind. So wurde z.B. in experimentellen Tiermodellen der
Multiplen Sklerose, des Typ I Diabetes und von
entzündlichen Darmerkrankungen die Fähigkeit dieser Zellen
30 gezeigt, die entsprechenden Krankheitsbilder zu
unterdrücken.

Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine akute
autoimmun-inflammatorische Erkrankung des peripheren
menschlichen Nervensystems. Die Inzidenz von GBS liegt bei
1-2 pro 100.000 Menschen. Die chronische Verlaufsform ist
5 die chronische demyelinisierende Polyneuropathie (CDP).
Die Inzidenz von CDP liegt bei 10-20 pro 100.000 Menschen.
mAb oder verwandte Substanzen zur Prävention und/oder
Behandlung dieser Krankheiten sind nicht bekannt.

10

Technisches Problem der Erfindung.

Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, eine
pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, mittels welcher
15 sich regulatorische T-Zellen stimulieren lassen und welche
sich insbesondere zur Prävention und/oder Behandlung der
multiplen Sklerose, Typ I Diabetes, entzündlichen
Darmerkrankungen, GBS und/oder CDP eignet.

20

Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung
die Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen
25 monoklonalen Antikörpers (mAb) oder einer
Mimikriverbindung hierzu, zur Herstellung einer
pharmazeutischen Zusammensetzung zur Induktion und/oder
Vermehrung regulatorischer T-Zellen.

30 Die Erfindung beruht zunächst auf der Erkenntnis, daß
mittels superagonistischer CD28 spezifischer
Wirksubstanzen, mAb oder Mimikriverbindungen hierzu,
CD4+CD25+ T-Zellen sich induzieren lassen, i.e. deren Zahl

nach Behandlung eines Organismus mit der Wirksubstanz deutlich höher ist als in einem Organismus, welcher nicht oder mit nicht-superagonistischen Wirksubstanzen behandelt wurde.

5

Weiterhin beruht die Erfindung auf der Erkenntnis, daß die erfindungsgemäß eingesetzten Wirksubstanzen offenbar ein sehr gutes Mittel zur Behandlung des Guillian-Barré-Syndroms und/oder der chronisch demyelinisierenden

10 Polyneuropathie sowie weiteren autoimmun-verbundenen Krankheiten ist. Daher lehrt die Erfindung weiterhin die erfindungsgemäße Verwendung zur Behandlung dieser Krankheiten.

15 Erfindungsgemäß verwendete superagonistische CD28 spezifische Wirksubstanzen, i.e. mAb oder Mimikriverbindungen hierzu, sind solche, die unabhängig von der Besetzung des Antigenrezeptors mehrere bis alle Untergruppen der T-Lymphozyten aktivieren.

20

Die Wirksubstanz bindet an CD28 oder an eine Teilsequenz hieraus. Die Teilsequenz kann beispielsweise eine Aminosäuresequenz Seq.-ID 1, oder 2 - 7, oder 17 enthalten, welche zumindest teilweise im Bereich des C'-D

25 Loops von CD28 liegen. An eine der Sequenzen mit Val am 5'-Ende kann eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz 8 in der dort definierten Reihenfolge angeschlossen sein. Das Loop liegt im Bereich mit der Sequenz GNYSQQQLQVYSKTGF. Erfindungsgemäße Mimikriverbindungen lassen sich in einem
30 Screeningverfahren identifizieren, wobei eine prospektive Mimikriverbindung oder eine Mischung von prospektiven Mimikriverbindungen einem Bindungsassay mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbesondere dem C'-D-Loop,

unterworfen werden, und wobei an CD28 oder an die Teilsequenz hieraus bindende Wirksubstanzen selektiert werden, ggf. gefolgt von einem Assay zur Prüfung auf superagonistische Stimulation von mehreren bis allen 5 Untergruppen der T-Lymphozyten. Im Falle einer Mischung wird es zweckmäßig sein, eine Dekonvolution durchzuführen. Unter den selektierten Mimikriverbindungen kann gleichsam ein Ranking nach Maßgabe der Selektivität und/oder Affinität erfolgen, wobei hochaffine Wirksubstanzen 10 bevorzugt sind. Zusätzlich oder anstelle eines solchen Rankings kann ein Ranking anhand einer Quantifizierung der Induktion der Regulator T-Zellen erfolgen bzw. anhand der Hemmung der Erkrankung beispielsweise im Tierversuch anhand von Krankheitsmodellen.

15 Ein Beispiel einer erfindungsgemäß verwendeten Wirksubstanz ist ein superagonistischer CD28 spezifischer mAb. Er ist beispielsweise herstellbar, indem ein nichtmenschliches Säugetier mit CD28 oder einem Peptid mit 20 einer Teilsequenz hieraus, beispielsweise wie vorstehend angegeben oder Homologen hierzu, immunisiert wird, wobei aus dem nichtmenschlichen Säugetier Zellen entnommen und aus den Zellen Hybridomzellen hergestellt werden, und wobei die so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe 25 selektiert werden, daß in deren Kulturüberstand mAb enthalten sind, die an CD28 binden. Mit üblichen Verfahren kann eine Humanisierung durchgeführt werden. Geeignete mAb lassen sich alternativ dadurch herstellen, daß B-Lymphozyten selektiert werden, welche an das Loop 30 binden, und deren exprimierte Immunglobulingene kloniert werden. Auch ist eine Isolierung geeigneter mAb aus Phagenbibliotheken möglich.

Im Einzelnen kann es sich um einen mAb handeln, welcher mit Hybridomzellen, wie hinterlegt unter den DSM Nummern DSM ACC2531 (mAb: 9D7 bzw. 9D7G3H11) oder DSM ACC2530 (mAb: 5.11A bzw. 5.11A1C2H3), erhältlich ist. Der mAb kann 5 eine oder mehrere der Sequenzen Seq.-ID 9, 11, 13 und/oder 15, oder eine oder mehrere Sequenzen Seq.-ID 10, 12, 14, 16, 18 und/oder 19 oder hierzu homologe Sequenzen enthalten bzw. dadurch (teilweise) codiert sein. In SEQ-ID 13 ist die Nukleinsäuresequenz der variablen Region der 10 schweren Kette eines erfindungsgemäßen mAb 5.11A wiedergegeben. SEQ-ID 14 zeigt das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 15 zeigt die Nukleinsäuresequenz der variable Region der leichten Kette dieses mAb. SEQ-ID 16 ist das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 9 zeigt die 15 Nukleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette eines erfindungsgemäßen mAb 9D7 wiedergegeben. SEQ-ID 10 zeigt das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 11 zeigt die Nukleinsäuresequenz der variable Region der schweren Kette dieses mAb. SEQ-ID 12 ist das hierdurch 20 codierte Peptid. SEQ-ID 18 und 19 zeigen Aminosäuresequenzen der variablen Region eines humanisierten mAb 5.11A, und zwar der leichten Kette und der schweren Kette, respektive.

25 Die Erfindung betrifft schließlich auch Heilverfahren, bei welchen einer auf niedrige Regulator T-Zellzahlen bzw. hohe T-Lyphozyten-Infiltration in Organen oder Gewebe beruhenden Erkrankung, beispielsweise einer an GBS und/oder CDP leidenden Person, eine erfindungsgemäße 30 pharmazeutische Zusammensetzung in pharmakologisch wirksamer Dosierung und in für die Verabreichung geeigneter galenischer Herrichtung verabreicht wird.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert. Hierbei sind in den Figuren 1 bis 9 sowie den begleitenden Textteilen hierzu Verfahrensweisen und
5 Ergebnisse gezeigt, die einerseits Zielstrukturen für die Findung geeigneter Wirksubstanzen darstellen und andererseits erfindungsgemäß einsetzbare Wirksubstanzen beschreiben. In den Figuren 10 bis 15 sind Ergebnisse dargestellt, die die Induktion regulatorischer T-Zellen
10 durch erfindungsgemäß eingesetzte Wirksubstanzen belegen. In den Figuren 16 bis 21 sind Ergebnisse dargestellt, die die Wirkung erfindungsgemäßer Wirksubstanzen in einem Tiermodell, der experimentellen allergischen Neuritis der LEW-Ratte (EAN) belegen. Bei der EAN handelt es sich um
15 ein Modell für das humane GBS und der CDP (auch CIDP bzw. chronische inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie genannt). Es zeigen:

Fig. 1: Stimulation von T-Lymphozyten der Ratte mit
20 verschiedenen CD28 spezifischen mAb (a: Costimulation, b: superagonistische Stimulation),

Fig. 2: einen Sequenzvergleich zwischen Maus, Ratte und Human CD28 im Bereich des C'-D Loops
25 (eingekastelt),

Fig. 3: experimentelle Ergebnisse zur Lokalisierung der Bindungsstelle superagonistischer mAb am CD28 Moleküle der Ratte,
30

Fig. 4: Bindung von verschiedenen human CD28 spezifischen mAb an CD28 (a) sowie costimulatorische (b) und

superagonistische (c) Aktivität der mAb aus Figur 4a,

Fig. 5: Bindungsversuche, die belegen, daß
5 superagonistische mAb spezifisch an das C'-D Loop binden,

Fig. 6: eine dreidimensionale Darstellung von CD28 mit
Markierung des C'-D Loop,

10

Fig. 7: Experimente zur Aktivierung von Zellen mittels
erfindungsgemäßer mAb,

Fig. 8: Darstellung der Sequenzen SEQ-ID 9 - 16 (a - h),
15 sowie der humanisierten variablen Domäne des
Antikörpers 5.11A (leichte Kette: VLC5.11, i;
schwere Kette: VHC5.11, j), SEQ-ID 18 - 19,

Fig. 9: Frequenz der CD4+CD25+ Zellen an der
20 Gesamtpopulation der CD4 Zellen einer Ratte, im
Vergleich nach Behandlung mit einem
superagonistischen CD28 spezifischen mAb und einem
costimulatorischen mAb,

25 Fig. 10: phänotypische Charakterisierung von durch
superagonistische CD28 spezifische mAb
induzierten CD4+CD25+ Zellen und Vergleich mit
CD4+CD25- und CD4+CD25+ Zellen aus unbehandelten
Kontrolltieren,

30

Fig. 11: Induktion der Proliferation von CD4+CD25+
T-Zellen durch superagonistische CD28 spezifische
mAb in Zellkultur,

- Fig. 12: Weitere Phänotypisierung der gemäß Fig. 11 erhaltenen CD4+CD25+ T-Zellen,
- 5 Fig. 13: inhibitorische Funktion der regulatorischen T-Zellen,
- Fig. 14: Experimente entsprechend Fig. 11 mit menschlichen T-Zellen und Einsatz superagonistischer human-CD28 spezifischer mAb,
- 10
- Fig. 15: Krankheitsverlauf der aktiven EAN unter Behandlung mittels superagonistischer CD28 spezifischer mAb im Vergleich mit costimulatorischen mAb,
- 15
- Fig. 16: Wirkung gegen EAN durch Gabe superagonistischer CD28 spezifischer mAb vor der Immunisierung mit dem EAN induzierenden Autoantigen,
- 20
- Fig. 17: Behandlung entsprechend Fig. 15, jedoch mit abweichendem Behandlungsplan,
- Fig. 18: Behandlung entsprechend Fig. 15, jedoch für den Fall der passiven bzw. adoptiv-Transfer EAN,
- 25
- Fig. 19: Sortierung humaner CD4+ Zellen in CD4+CD25+++ und CD4+CD25- T-Zellen,
- 30 Fig. 20: Wachstumskurven von durch erfindungsgemäße monoklonale Antikörper und IL-2 expandierten T-Zellen aus Fig. 19 (sortiert),

Fig. 21; CTLA-4 Expression der expandierten T-Zellen aus Fig. 20,

5 Fig. 22: Funktionelle Analyse der expandierten T-Zellen aus Fig. 20 mittels eines Suppressions-Assays, A: Proliferation der Indikatorzellen ohne und mit Stimulation (CD3/anti CD28), B: Unterdrückung der Proliferation der Indikatorzellen in Anwesenheit expandierter CD4+CD25+++ T-Zellen.

10

Fig. 1 zeigt die Stimulation frisch isolierter T-Lymphozyten der Ratte in Form eines ³H-Thymidin-Einbaus. Die Methodik entspricht jener, wie in der Literaturstelle
15 WO98/54225 beschrieben, auf welche hier und folgend vollumfänglich Bezug genommen wird und deren Offenbarungsinhalt hiermit in den vorliegenden Text inkorporiert wird. In der Fig. 1a ist die Costimulation gezeigt, d. h. in allen Näpfen waren T-Zellrezeptor
20 (TCR)-spezifische mAb an die Plastikoberfläche gebunden. Mangels Costimulation zeigt die Negativkontrolle (oberste Reihe) keinen Einbau. Costimulation wird sodann durch die Zugabe CD28-spezifischer mAb in löslicher Form gegeben. Zum Einsatz kam die gesamte gezeigte Palette
25 CD28-spezifischer mAb. Diese Serie von verschiedenen CD28-spezifischen mAb stammt aus einem in WO98/54225 bereits beschriebenen Ansatz der Immunisierung und Herstellung von Hybridom-Zelllinien. Es handelt sich um Kulturüberstände, die genug CD28-spezifische mAb für eine
30 sättigende Bindung an 2×10^5 T-Zellen enthielten. Der Figur 1a ist entnehmbar, daß sämtliche dieser mAb in der Lage sind, costimulierend zu aktivieren, d.h. in Anwesenheit der anti-TCR mAb den Thymidin-Einbau

anzuregen. In Fig. 1b ist die Stimulation in Abwesenheit TCR-spezifischer mAb gezeigt. Auch dieses Experiment wurde so durchgeführt, wie in der Literaturstelle WO98/54225 beschrieben. Man erkennt, daß nur zwei mAb in der Lage
5 sind, in Abwesenheit eines TCR-Signals die T-Lymphozyten zu stimulieren. Diese mAb besitzen also superagonistische Aktivität.

Im Weiteren wurde untersucht, ob costimulatorische und
10 superagonistische CD28-spezifische mAb an unterschiedliche Bereiche des CD28-Moleküls binden. Die mAb wurden durch Immunisierung von Mäusen mit CD28 der Ratte hergestellt; erwartungsgemäß reagieren sie deshalb alle nicht mit Maus CD28 (nicht gezeigt). Da die mAb also nur solche Bereiche
15 des Ratten CD28-Moleküls erkennen können, die sich von dem der Maus unterscheiden, wurde zunächst ein Sequenzvergleich zwischen CD28 der Maus und der Ratte vorgenommen (siehe Fig. 2, oberer Teil). Die Unterschiede zwischen beiden Spezies sind hervorgehoben. Zur Benennung
20 der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Als Prototypen für einen konventionellen Ratten-CD28-spezifischen mAb wurde JJ319, für einen superagonistischen mAb wurde JJ316 verwendet (siehe WO98/54225).

25

In Figur 3 ist die Kartierung der Bindung gezeigt. Es wurden Expressionsplasmide konstruiert, in denen ein Teil der extrazellulären Domäne von CD28 aus der Maus, ein anderer aus der Ratte stammt. Dies ist jeweils symbolisch
30 durch Balken bzw. Striche dargestellt; rechts daneben ist die Bindung der mAb JJ316 und JJ319 an Maus-Fibroblasten (L929-Zellen) gezeigt, die mit diesen Expressionsplasmiden transfiziert worden waren. In den ersten beiden Zeilen der

Abb. 3 (m/r und r/m 1-37) wird die Bindung beider Antikörper zur "rechten" Hälfte der Sequenz kartiert: Beide binden, wenn diese aus der Ratte stammt; Im umgekehrten Konstrukt (rm CD28 1-37, links Ratte, rechts Maus) findet keine Bindung statt. In der dritten Zeile (m/r CD28 1-66) wird gezeigt, dass JJ316 nicht mehr bindet, während der noch vorhandene Teil der Rattensequenz ("rechts") für die Erkennung durch JJ319 noch ausreicht. Demnach erkennen die beiden mAb unterschiedliche Epitope auf dem CD28-Molekül, und die Bindung des Superagonisten JJ316 muss folglich in dem Bereich zu suchen sein, der in dem Konstrukt der ersten Zeile, nicht aber in dem Konstrukt der dritten Zeile aus der Ratte stammte. Klarer Kandidat dafür ist der in Figur 2 eingekastelte Bereich.

15

In den Zeilen 4 und 5 der Figur 3 wurden deshalb zunächst zwei und dann drei Aminosäuren in diesem Bereich des Maus CD28-Moleküls so verändert, dass sie nun die Rattensequenz darstellen. Durch diese "Transplantation" von nur drei Aminosäuren konnte die Bindungsfähigkeit für mAb JJ316, nicht aber (wie erwartet) die von JJ319 übertragen werden. In Tab. 1 sind die Bindungsdaten für die ganze Palette CD28-spezifischer mAb zusammengefasst. Es ergibt sich eine eindeutige Korrelation: Die beiden mAb, die auch ohne TCR-Stimulation funktionieren (Superagonisten) erkennen das besagte ("eingekastelte", Figur 2) Epitop, die konventionellen (nur costimulatorischen) mAb dagegen nicht. Ein costimulatorischer mAb (5S35) erkennt das eingekastelte Epitop sehr schwach und bindet sehr stark an das "konventionelle" Epitop.

30

Die nächsten Figuren beschäftigen sich mit superagonistischen human-spezifischen mAb. Auch diese

wurden in Mäusen hergestellt, reagieren also nicht mit dem CD28-Molekül der Maus. Die Mäuse wurden mit human-CD28-transfizierten A20/J Maus B-Lymphomzellen immunisiert (siehe WO98/54225) und zusätzlich vor der Fusion mit käuflich erhältlichem human CD28-FC Fusionsprotein geboostert (von R und D Systems gekauft). In einer Serie von Fusionsexperimenten wurden aus mehreren Tausend Zelllinien ca. 20 identifiziert, die human-CD28 spezifische mAb produzieren (Bindung an Maus L929 Zellen, die human-CD28 exprimieren, aber nicht an untransfizierte L929 Zellen), analog zum Screen in der Literaturstelle WO98/54225. Von diesen zeigten zwei die gesuchte superagonistische Aktivität (9D7 und 5.11A), während alle neuen mAb konventionelle costimulatorische Aktivität besitzen. Im Weiteren werden insbesondere die beiden superagonistischen mAb beschrieben. Als Beispiel für einen konventionellen human-CD28-spezifischen mAb wird der ebenfalls neu generierte mAb 7.3B6 verwendet.

Figur 4a zeigt, dass die verwendeten Präparate der drei neuen mAb vergleichbar gut und auch mit vergleichbarem Titer an menschliche T-Lymphozyten binden. Gezeigt ist ein Experiment, in dem frisch isolierte mononukleäre Zellen aus dem menschlichen Blut (sog. PBMC) zunächst mit verschiedenen Verdünnungsstufen der eingesetzten mAb auf Eis behandelt wurden; dann wurde gewaschen und der gebundene mAb durch einen Fluoreszenz-Farbstoff markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht, der spezifisch die gebundenen Maus mAb erkennt. Durch Verwendung eines weiteren mAb, der menschliche CD4 T-Zellen detektiert und an den ein zweiter Fluoreszenz-Farbstoff gebunden war, konnte die Bindung der titrierten mAb durch elektronisches gating selektiv für CD4 T-Lymphozyten bestimmt werden.

Angegeben ist mit "MFI" die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, die ein Maß für die Menge des gebundenen CD28-spezifischen mAb darstellt. Die Konzentrationen stellen 3-fach Verdünnungen eines
5 standardisierten Ausgangspräparats dar. Es ist durchaus normal, dass bei diesem Test die höchste Konzentration ein schwächeres Signal gibt als die folgenden Titrationsschritte; dies hat mit der Avidität (bivalente Bindung) von mAb zu tun und spielt in den hier
10 diskutierten Zusammenhängen keinerlei Rolle.

Die Figuren 4b und c vergleichen die Fähigkeiten superagonistischer human-CD28-spezifischen mAb mit jenen konventioneller CD28-spezifischer mAb - in An- und
15 Abwesenheit eines TCR-Signals - frisch isolierte menschliche T-Zellen zum Wachstum zu stimulieren. Gezeigt ist wiederum ein 3H-Thymidin Einbau, wie vorstehend für die Ratte beschrieben. Für Figur 4b waren die Näpfe mit einem mAb beschichtet, der mit dem menschlichen
20 TCR/CD3-Komplex reagiert. Es wurde also Costimulation gemessen. Man erkennt, daß die Proliferation ohne Costimulation mit einem der mAb ausbleibt (Negativkontrolle), alle drei Antikörper sind jedoch in der Lage, die Zellteilung zu stimulieren. Für Figur 4c
25 wurde in Abwesenheit eines TCR/CD3-spezifischen mAb gearbeitet. Nur die Antikörper 9D7 und 5.11A konnten superagonistisch stimulieren.

Nachdem das Epitop für superagonistische mAb bei der Ratte
30 definiert ist und zwei neue superagonistische mAb mit Spezifität für menschliches CD28 isoliert worden waren, wurde überprüft, ob diese mAb an die entsprechende Stelle des menschlichen CD28-Moleküls binden. Wie aus Figur 2

ersichtlich, unterscheiden sich die CD28-Moleküle der Maus und des Menschen in zahlreichen Positionen. Aufbauend auf der Kartierung des superagonistischen Epitops bei der Ratte wurde deshalb direkt geprüft, ob sich die

5 Bindungsstelle für das superagonistische Epitop auf menschlichem CD28 auf das CD28-Molekül der Maus durch "Transplantation" der fünf Aminosäuren dieses homologen Bereiches erreichen lässt. Die Ergebnisse sind in der Figur 5 gezeigt. Vor dem Hintergrund der homogen

10 dargestellten Maus-Sequenz für die extrazelluläre Domäne des CD28-Moleküls (Mitte) sind als Striche die ausgetauschten (Maus zu human) Aminosäurepositionen dargestellt (unten). Die Zahlen an der Seite geben zusätzlich noch die einzelnen Positionen und Mutationen an

15 (F60V bedeutet z.B., dass an Position 60 das Phenylalanin der Maus durch ein Valin der menschlichen Sequenz ersetzt wurde). Daneben ist die Bindung der drei untersuchten mAb dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, erkennen zwar alle drei mAb menschliches CD28, nur die beiden mAb 9D7 und

20 5.11A reagieren jedoch mit dem Maus CD28-Molekül, dem die fünf Aminosäuren des menschlichen CD28 an der entscheidenden Stelle transplantiert worden waren. Angesichts der Vielfalt von Unterschieden ist diese gezielte Herstellung der Reaktivität überraschend und

25 bestätigt in vollem Maße die aus den Experimenten mit Ratten CD28 abgeleitete Erkenntnis, dass superagonistische mAb an eine bestimmte, nämlich diese Stelle des Moleküls binden müssen.

30 In Figur 6 ist ein dreidimensionales Modell des CD28-Moleküls gezeigt. Die neu identifizierte Bindungsregion ist hervorgehoben. Sie entspricht der eingekastelten Sequenz in Figur 2. Die extrazelluläre

Domäne von CD28 gehört strukturell zur sog. Immunglobulin-Superfamilie, die sich durch zwei übereinanderliegende β -Faltblätter als Grundstruktur auszeichnet. Die Beschriftung dieser Bänder erfolgt nach
5 einem in der Literatur vorgegebenen Muster. Wichtig für die hier gezeigte Darstellung ist, dass die als Epitop für superagonistische CD28-spezifische mAb in Ratte und Maus identifizierte Region als "C'-D loop" bezeichnet wird. Es wurde also gezeigt, dass mAb mit Spezifität für den
10 C'-D Loop des CD28-Moleküls superagonistische Aktivität besitzen, also im Sinne der Literaturstelle WO98/54225 zur Aktivierung von T-Lymphozyten eingesetzt werden können. Die superagonistische Aktivität C'-D Loop spezifischer mAb in Ratte und Mensch zeigt, dass es dabei nicht auf die
15 Sequenz des Epitops, sondern auf seine Lage bzw. Form ankommt.

In den Experimenten der Fig. 7 wurde untersucht, ob erfindungsgemäße mAb nicht nur binden (siehe Figuren 3 und
20 5), sondern ob auch tatsächlich eine Aktivierung erfolgt. Hierfür wurden T-Tumorzellen der Maus, BW, entweder mit dem Konstrukt der Figur 3, Zeile 5, (Ratten C'-D Loop Übertragung) oder mit dem Konstrukt der Figur 5, Zeile 3, (human C'-D Loop) transfiziert. Die Aktivierung dieser
25 Zellen wird nicht durch Zellteilung gemessen (sie proliferieren ohnehin), sondern durch die Produktion des Zytokins IL-2. Figur 7 zeigt, daß ohne Stimulation keine IL-2 Produktion erfolgt (Negativkontrolle). Stimulation mit einem T-Zellrezeptor-spezifischen mAb induziert IL-2
30 Produktion (Positivkontrolle). Figur 7a zeigt zeigt die Ergebnisse bei Einsatz des superagonistischen mAb JJ316 der Ratte, während Figur 7b Ergebnisse für den human C'-D Loop spezifischen mAb 5.11A zeigt. In beiden Fällen werden

die jeweiligen Zelllinien zur IL-2 Produktion stimuliert. Erwartungsgemäß erfolgt die Stimulierung jedoch nicht mittels "konventioneller" CD28 spezifischer mAb, da diese nicht nur nicht an das C'-D Loop bindet, sondern das
5 Konstrukt überhaupt nicht erkennen können, weil sie für ratten- bzw. humanspezifische Sequenzen spezifisch sind, die in dem Konstrukt nicht enthalten sind.

In der Figur 9 sind Dot Plots gezeigt, bei denen jede
10 gemessene Zelle durch einen Punkt dargestellt ist. Die phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen erfolgte dabei durch Kombination der Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD25. Hierzu werden die Zellsuspensionen mit entsprechend Fluoreszenzfarbstoff-
15 markierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4 bzw. CD25 inkubiert, gewaschen und in einem Durchflußzytrophotometer auf Bindung dieser Antikörper untersucht. Die gezeigten Ergebnisse wurden drei Tage nach i.p. Injektion eines costimulatorischen (Fig. 9a, JJ319) oder superagon-
20 istischen CD28 spezifischen mAb (Fig. 9b, JJ316) erhalten. Im Falle von JJ319 sind etwa 7% der CD4 T-Zellen auch CD25 positiv ($4/(50+4)$), was nicht gezeigten Ergebnissen in unbehandelten Tieren entspricht. Dagegen sind nach Behandlung mit JJ316 ca. 20% CD4+CD25+ ($10/(10+40)$). Zudem
25 ist das Niveau der CD25 Expression weitaus höher als im Kontrolltier. Ein solch hohes Niveau ist charakteristisch für regulatorische T-Zellen.

Die Figur 10 zeigt eine phänotypische Charakterisierung in
30 Darstellung als Histogramm. Dabei wurde in den Figuren 10a bis 10c der Marker CD45RC detektiert, eine hochmolekulare Isoform des CD45 Moleküls, welche auf naiven CD4 T-Zellen stark, auf stimulierten CD4 T-Zellen jedoch niedrig

exprimiert wird. Eine niedrige Expression ist für regulatorische T-Zellen typisch. Fig. 10a zeigt, daß CD4+CD25- Zellen aus unbehandelten Tieren CD45RC mehrheitlich stark exprimieren. Dagegen findet im Falle von CD4+CD25+ Zellen aus unbehandelten Tieren starke Expression nur in einer deutlichen Minderheit aller Zellen statt (Fig. 10b). Im Falle der Behandlung mit dem superagonistischen CD28 spezifischen mAb (Fig. 10c) ist die Herunterregulierung von CD45CD45RC noch weitaus stärker ausgeprägt als im Falle der Figur 10b. Im Falle der Figuren 10d bis 10e das von regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimierte CD152 (CTLA-4) durch Anfärbung detektiert. Diese Anfärbung muß aufgrund der intrazellulären Lokalisation von CD152 nach Permeabilisierung fixierter Zellen durchgeführt werden und ist deshalb mit einem unspezifischen Hintergrund behaftet. Zur Kontrolle hierauf wurde eine sogenannte Isotypenkontrolle mitgefahren, i.e. es wurde eine intrazelluläre Anfärbung mit einem mAb der gleichen Immunglobulinklasse, welcher jedoch nichts spezifisch erkennen kann, durchgeführt. Der spezifische CD152 Nachweis ergibt sich dabei als Verschiebung des CD152 Histogramms gegenüber dem Isotyp-Kontrollhistogramm. Man erkennt in Fig. 10d keine Verschiebung und folglich keine CD152 Expression in den CD4+CD25- Zellen. In den unbehandelten CD4+CD25+ Zellen ist eine schwache Verschiebung (Fig. 10e) und in den JJ316 (superagonistischer CD28 spezifischer mAb) behandelten Zellen eine stärkere Verschiebung erkennbar in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Figuren 10a bis 10c.

Im Ergebnis ist mit den Figuren 9 und 10 phänotypisch gezeigt, wie regulatorische T-Zellen identifizierbar sind, und daß superagonistische CD28 spezifische mAb in vivo regulatorische CD4 T-Zellen präferentiell vermehren bzw. 5 induzieren.

In der Figur 11 wurden CD4+CD25+ Zellen durch elektronische Zellsortierung entweder aus unbehandelten Ratten (Fig. 11a) oder aus mit JJ316 behandelten Ratten 10 (Fig. 11b) isoliert und in 96 Napfplatten gemäß dem Stand der Technik kultiviert. Zellvermehrung wurde durch 3H Thymidineinbau zwischen Tag 2 und 3 der Kultivierung gemessen. "(-)" bedeutet keine Stimulierung, Kostimulation bedeutet Stimulation mit einem nicht-superagonistischen 15 CD28 spezifischen mAb (JJ319) sowie mit dem TCR-spezifischen R73, und JJ316 zeigt die superagonistische Stimulation. Sowohl Fig. 11a als auch 11b zeigen, daß regulatorische T-Zellen schlecht auf Kostimulation, jedoch gut auf Stimulation mit einem 20 superagonistischen CD28 spezifischen mAb reagieren. Stimulation mit erfindungsgemäß eingesetzten mAb zeigt also auch in Zellkultur eine beachtliche Vermehrung regulatorischer T-Zellen.

25 Figur 13 zeigt eine Darstellung entsprechend Figur 10f, jedoch nach in vitro Stimulation mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316). Man erkennt eine noch stärker nachweisbare CD152 Expression.

30 In der Figur 13 ist die inhibitorische Funktion regulatorischer T-Zellen auf CD4+CD25- T-Zellen, welche als Indikatorzellen für den suppressorischen Effekt dienen, dargestellt. Als Stimulus für die CD4+CD25-

T-Zellen wurde Kostimulation (R73 + JJ319) verwendet. Gemessen wurde der 3H Thymidineinbau zwischen Tag 2 und 3 der Kultivierung. CD25+ bedeutet elektronisch sortierte CD4+CD25+ T-Zellen aus drei Tage zuvor mit
5 superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Tieren. CD25- steht für die Indikatorzellen. CD25+/CD25- bedeutet in Fig. 13a, daß beide Zellpopulationen zu gleichen Teilen miteinander gemischt wurden. Man erkennt, daß die CD25+ Zellen auf
10 Kostimulation nicht mit Proliferation reagieren. Zudem wird zusätzlich die Proliferation von Indikatorzellen unterdrückt. In der Figur 13b ist eine Titration der regulatorischen T-Zellen durch Mischung mit Indikatorzellen in verschiedenen Mengenverhältnissen
15 dargestellt. Man erkennt, daß selbst bei einem Verhältnis regulatorischer zu Indikatorzellen von 1:16 noch Suppression zu beobachten ist. Dies zeigt die hohe Effektivität der mit erfindungsgemäß verwendeten mAb stimulierten regulatorischen Zellen.
20

Figur 14 zeigt einen Vergleich der Reaktionen humaner CD4+CD25- T-Zellen (naive Zellen) zu CD4+CD25+ T-Zellen (regulatorische Zellen) in Antwort auf Kostimulation (anti-CD3 + konventionelle anti-CD28 mAb) bzw. auf
25 human-spezifische superagonistische CD28 spezifische mAb (9D7 und 5.11A). Die Versuche entsprechen jenen, wie vorstehend für die Ratte beschrieben. Von links beginnend zeigen die ersten drei Gruppen unstimulierte Kontrollen (kein 3H Thymidineinbau). Es handelt sich dabei um die
30 gesamten CD4+ T-Zellen, dann die durch Sortierung gewonnene CD25- Fraktion und schließlich die durch Sortierung gewonnene CD25+ Fraktion. "med" bedeutet Medium. Hieran schließen sich zwei Gruppen an, bei welchen

superagonistisch stimuliert wurde (9D7 und 5.11A). Man erkennt, daß die regulatorischen T-Zellen auf die Stimulation mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb im Vergleich zur Gesamtpopulation der CD4+ Zellen und ihrer CD25- Fraktion besser reagieren. Die letzte Dreiergruppe zeigt die Ergebnisse der konventionellen Kostimulation. Hier ist demgegenüber die Reaktion der ungetrennten T-Zellen sowie der CD25- Fraktion eher besser.

10

Im Ergebnis ist sowohl für Ratten T-Zellen als auch im humanen System belegt, daß superagonistische CD28 spezifische mAb regulatorische T-Zellen besser induzieren bzw. vermehren als konventionelle Kostimulation. Weiterhin ist belegt, daß dies auch im intakten Organismus verifiziert werden kann.

In Figur 15 ist der Krankheitsverlauf der aktiven EAN unter Behandlung mit verschiedenen mAb dargestellt. Verwendet wurden 7-8 Wochen alte weibliche LEW Ratten erhältlich vom Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden mit einem synthetischen Peptid immunisiert, welches einem Teil des Myelinproteins P2, das periphere Nervenfasern umhüllt, entspricht (Aminosäuren 53-78 des bovinen P2 Proteins, 50µl einer 0,5mg/ml Lösung, Inokulation in den Fußballen). Nach ca. 10 Tagen entwickelt sich eine progressive Lähmung, welche nach einem standardisierten Scoring (King et al., Exp Neurol, 87:9-19 (1985) quantifiziert werden kann. Figur 15a zeigt eine präventive Therapie mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) und Figur 15b Behandlung mit konventionellen mAb (JJ319). Die Applikation erfolgte in 1mg/Tier Dosen i.p. entweder am Tag der P2 Immunisierung

(D0), am Tag 12 (D12), i.e. nach Beginn der Symptome, oder an beiden Tagen. Die verschiedenen Gruppen umfaßten 3 bis 6 Tiere. Ein Vergleich der Figuren 15a und 15b zeigt, daß die Behandlung mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb deutlich wirksamer ist als eine Behandlung mit konventionellen mAb.

Figur 16 zeigt Ergebnisse entsprechend der Figur 15, jedoch bei einer prophylaktischen Behandlung. d-7 ist Behandlung 7 Tage vor der Immunisierung, d-21 21 Tage vor der Immunisierung. Es ist erkennbar, daß ein resistenter Status durch Vermehrung regulatorischer T-Zellen bei Behandlung innerhalb einer Woche vor Immunisierung erreichbar ist, jedoch nicht bei Behandlung 3 Wochen vor der Immunisierung.

Figur 17 beruht auf einer Vorgehensweise, wie bei Figur 15, jedoch Behandlung mit JJ316 am Tage 0 sowie 4. Figur 17a zeigt den Krankheitsverlauf entsprechend der Darstellung der Figur 15a. Die Figur 17b zeigt elektrophysikalische Eigenschaften, nämlich Geschwindigkeit der Reizleitung als direkter klinischer Parameter für die Schädigung des Ischiasnerves. Die Messungen wurden entsprechend der Literaturstellen Adlkofer et al., Nat Genet, 11:274-280 (1995) und Heininger et al., Ann Neurol, 19:44-49 (1986) durchgeführt. Man erkennt den pathologischen Befund anhand der Kontrollgruppen insbesondere in der Verlängerung der N1 und F-Latenzen (siehe Tage 0 und 12, offene Symbole). Demgegenüber bleiben die Latenzen im Falle der mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Tieren zwischen Tag 0 und Tag 12 nahezu unverändert (gefüllte Symbole).

Nicht dargestellt sind ergänzende Untersuchungen, mit histologischem Nachweis der T-Zellinfiltration in Dünnschichten der Nerven. Der Nachweis der T-Zellen erfolgt mit einem für diese Technik geeigneten mAb, 5 nämlich B115 und Färbung der T-Lymphozyten. Die Zellkerne wurden andersfarbig gegengefärbt. In Vergleichsversuchen wurde festgestellt, daß in der nicht behandelten Kontrollgruppe eine höhere Zahl von T-Zellen infiltriert waren als in der mit einem superagonistischen CD28 10 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Gruppe, was auf eine Suppression durch regulatorische T-Zellen durch Einsatz erfindungsgemäßer mAb hindeutet.

Ebenfalls nicht gezeigt sind Experimente, in denen die 15 isolierenden Myelinscheiden angefärbt wurden. Behandlung mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb zeigte ein gesundes Bild, während die Kontrollgruppe Demyelinisierung, i.e. Zerstörung der isolierenden Myelinschichten, zeigte.

20

In der Figur 18 sind Ergebnisse einer Therapie der passiven oder adoptiv-Transfer EAN (AT-EAN) dargestellt. Diese wird nicht durch Immunisierung mit dem Nervenantigen, wie vorstehend beschrieben, induziert, 25 vielmehr erfolgt eine intravenöse Injektion eines autoreaktiven CD4+ T-Zellklons mit Spezifität für das P2 Myelinantigen (8×10^6 , Zelllinie G7) gemäß der Literaturstelle Stienekemeier et al., Brain, 122:523-535 (1999). Figur 18a zeigt den Krankheitsverlauf einer 30 Kontrollgruppe, bei Behandlung mit JJ316 am Tag 1 (d1) und bei Behandlung am Tag 3 (d3). Beachtlich ist, daß selbst nach Beginn der Krankheitssymptome, i.e. Behandlung am Tag 3, die Krankheit gestoppt werden kann. In der Figur 18b

ist für die drei Gruppen die Infiltration der Nerven mit T-Zellen quantifiziert worden und man erkennt, daß in der Kontrollgruppe dies zur Schädigung des Nerven führt. Dagegen sind die T-Zellzahlen bei Behandlung mit
5 erfindungsgemäß eingesetzten mAb erheblich niedriger aufgrund der Induktion regulatorischer T-Zellen.

In den Experimenten der Figuren 19 bis 22 ist schließlich belegt, dass mittels erfindungsgemäßer monoklonaler
10 Antikörper expandierte CD4+CD25+++ T-Zellen auch nach der Expansion ihre funktionellen Eigenschaften, z.B. die Unterdrückung der Proliferation "konventioneller" T-Zellen, aufrecht erhalten können. Zu diesem Zwecke wurden aus humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMC)
15 die CD4+ T-Zellen mittels Magnetseparation gereinigt (negative Depletion von CD8+, CD11b+, CD16+, CD19+, CD36+ und CD56+ Zellen; Reinheit 95%). Diese Zellen wurden dann mit einem CD25-spezifischen Antikörper und nachfolgend einem PE-konjugierten Sekundärantikörper beladen, in
20 CD4+CD25+++ und CD4+CD25- T-Zellen sortiert (siehe Figur 19) und nach Zugabe von an Dyna-beads gekoppelten erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern (hulG4) und Interleukin 2 (IL-2) kultiviert (Tag 0). Am Tag 5 erfolgte eine Färbung der expandierten Zellen mit anti-CD4 und anti
25 CD-25 an der Zelloberfläche, sowie intracellulär mit anti-CTLA-4 und Ki-67. Am Tag 6 erfolgte eine Trennung der Beads von den kultivierten Zellen und Entfernung des IL-2 durch wiederholtes Waschen, gefolgt von 2-tägiger Kultur nur in Medium. Die zwei Subpopulationen vermehrten sich
30 innerhalb von 8 Tagen um das zehnfache (siehe Figur 20). Die verstärkte Expression des Proteins CTLA-4 in den expandierten CD4+CD25+++ Zellen (siehe Figur 21) ist bereits indiziell dafür, dass diese Zellen ihren

regulatorischen Phänotyp beibehalten hatten. Dies wurde anschließend wie folgt durch eine funktionelle Charakterisierung verifiziert.

5 Syngene periphere mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Vollblut wurden gewonnen und mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE (Carboxy Fluorescein Diacetat Succininmidy Ester) markiert. Diese Zellen dienten als Indikatorzellen. Sie wurden zunächst mit anti CD3 und anti CD28 Antikörpern
10 drei Tage lang stimuliert. Mit jeder Zellteilung halbierte sich die Intensität der Markierungsmesswerte dieser Indikatorzellen (siehe Figur 22a). In unabhängigen Ansätzen wurden am Tag 8 expandierte CD4+CD25+++ bzw. CD4+CD25- T-Zellen mit den CFSE markierten Indikatorzellen
15 in Verhältnis 1:1 bzw. 1:5 gemischt und kokultiviert (Stimulation mit anti-CD3 mAK, Klon HIT3a, Endkonzentration 0,1 µg/ml, sowie anti-CD-28 mAK, Klon CD28.2, Endkonzentration 0,05 µg/ml). Figur 22b zeigt, dass die Anzahl der Zellteilungen in den Indikatorzellen
20 durch die Anwesenheit der expandierten CD4+CD25+++ T-Zellen stark reduziert wurde, während die CD4+CD25- T-Zellen nur einen geringen Effekt zeigten. Somit ist belegt, dass die mit erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern expandierten regulatorischen CD4+CD25+++
25 T-Zellen nach wie vor in der Lage waren, die Proliferation anderer "normaler" T-Zellen zu unterdrücken.

29

Tabelle I:

Bindung von anti-Ratten CD28 mAb an Maus- und Ratten CD28
und verschiedene CD28 Mutanten.

5 mAb	Maus CD28	Ratten CD28	mCD28, S62P A64V, E65G	m/rCD28 Mval269I
Kontr.	-	-	-	-
JJ316	-	+++	+++	-
10 JJ319	-	+++	-	+++
5S28	-	++	-	++
5S38.17	-	+++	+++	-
5S247	-	+++	-	+++
5G40/3	-	+++	-	+++
15 5G87	-	++	-	++
5G111	-	++	-	++
5S35	-	+++	+	+++

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen
5 monoklonalen Antikörpers (mAb) oder einer Mimikriver-
bindung hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen
Zusammensetzung zur Induktion und/oder Vermehrung regu-
latorischer T-Zellen in vitro und/oder in vivo.
- 10 2. Verwendung insbesondere nach Anspruch 1 zur Behandlung
und/oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen und/oder
Entzündungsreaktionen.
- 15 3. Verwendung insbesondere nach Anspruch 1 zur Behandlung
des Guillian-Barré-Syndroms (GBS) oder der chronischen
demyelinisierenden Polyneuropathie (CDP).
- 20 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der
mAb herstellbar ist indem ein nichtmenschliches Säuget-
tier mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbeson-
dere dem C'-D Loop, immunisiert wird, wobei aus dem
25 nichtmenschlichen Säugetier Zellen entnommen und aus
den Zellen Hybridomzellen hergestellt werden, und wobei
die so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe selek-
tiert werden, daß in deren Kulturüberstand mAb enthal-
ten sind, die an CD28 superagonistisch binden.
- 30 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die
Mimikriverbindung erhältlich ist in einem

- Screeningverfahren, wobei eine prospektive Mimikriverbindung oder eine Mischung von prospektiven Mimikriverbindungen einem Bindungsassay mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbesondere dem C'-D-Loop, unterworfen werden, und wobei an CD28 oder an die Teilsequenz hieraus bindende Wirksubstanzen selektiert werden, ggf. gefolgt von einem Assay zur Prüfung auf superagonistische Stimulation von mehreren bis allen Untergruppen der T-Lymphozyten.
- 10
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der mAb erhältlich ist aus Hybridomzellen, wie hinterlegt unter den DSM Nummern DSM ACC2531 (mAb: 9D7 bzw. 9D7G3H11) oder DSM ACC2530 (mAb: 5.11A bzw. 5.11A1C2H3).
- 15
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der mAb oder die Mimikriverbindung eine oder mehrere der Sequenzen Seq.-ID 9, 11, 13 und/oder 15, oder eine oder mehrere Sequenzen Seq.-ID 10, 12, 14 und/oder 16, oder eine oder mehrere Sequenzen 18 und/oder 19, oder hierzu homologe Sequenzen enthält.
- 20
- 25
8. Verfahren zur Behandlung oder Prophylaxe einer Erkrankung nach Anspruch 2 oder 3, wobei entweder
- 30
- einem Patienten eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend einen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper oder eine Mimikriverbindung hierzu und galenisch hergerichtet für eine definierte

und angewandte Darreichungsform, beispielsweise i.v. Injektion, verabreicht wird, oder

5 einem Patienten eine Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, enthaltend T-Lymphozyten oder Vorläuferzellen hierzu entnommen wird, die Körperflüssigkeit, ggf. nach einer Aufbereitungsverfahrensstufe, mit einem CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper oder einer Mimikriverbindung hierzu versetzt
10 wird und die so behandelte Körperflüssigkeit dem Patienten wieder dargereicht, beispielsweise i.v. injiziert, wird.

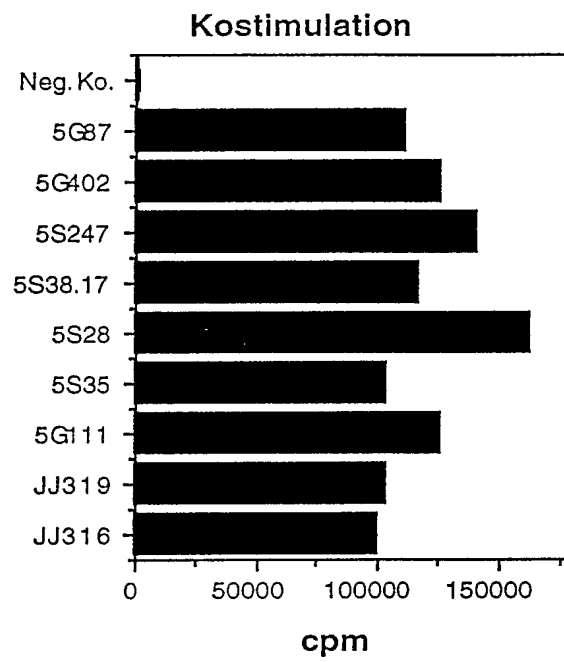
15

20

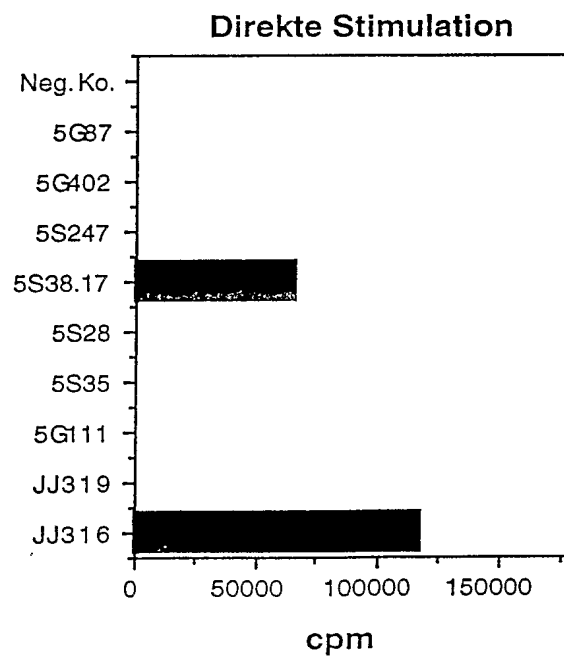
25

30

FIG. 1



a



b

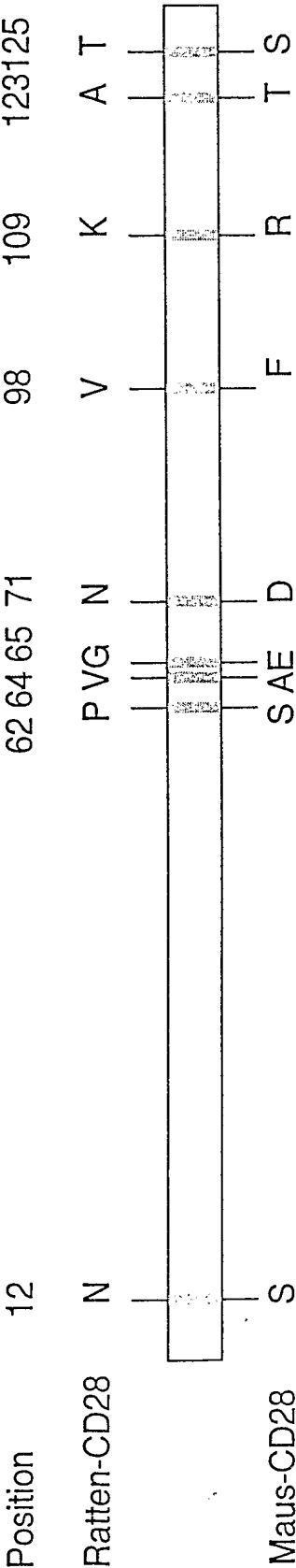


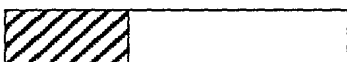
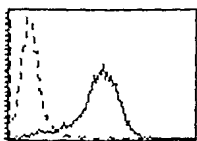
FIG. 2

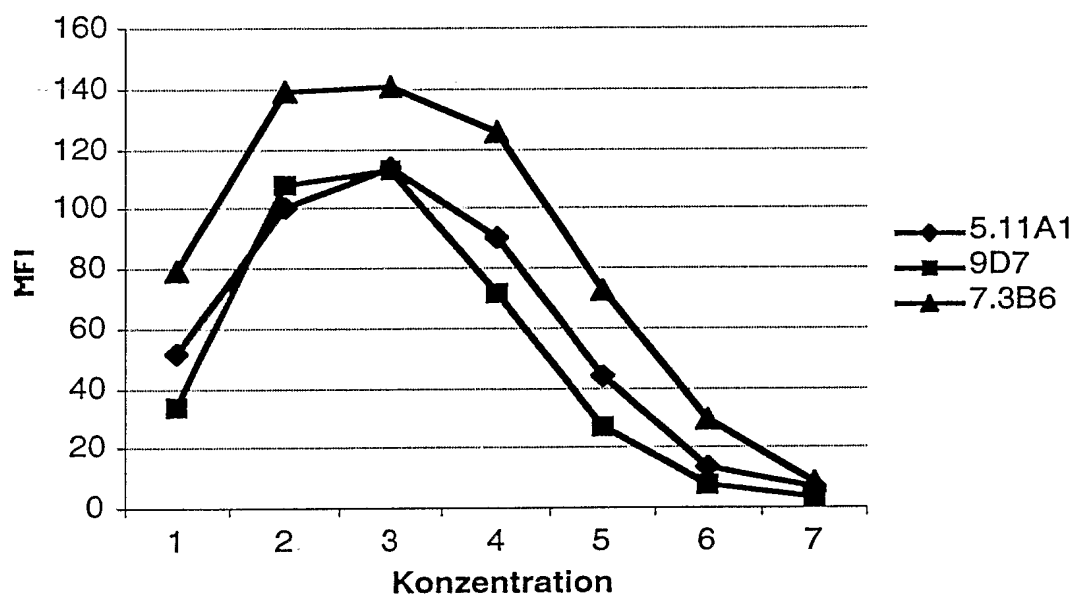
FIG. 3

 = Maus = Rattem/r CD28
1-37

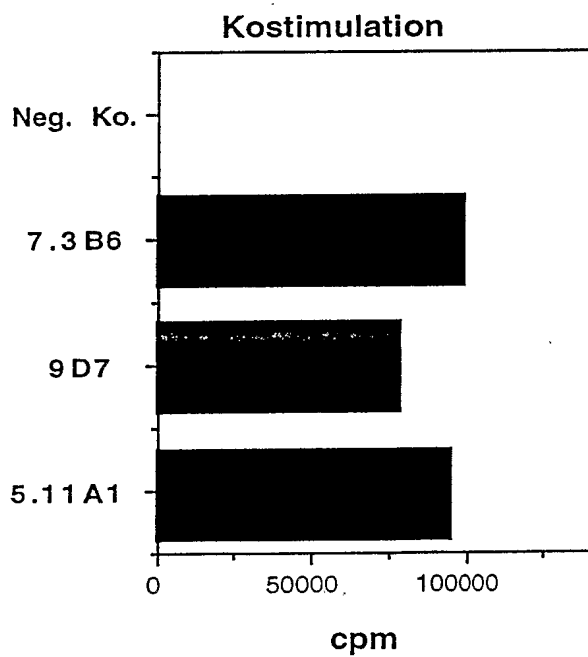
JJ316

JJ319

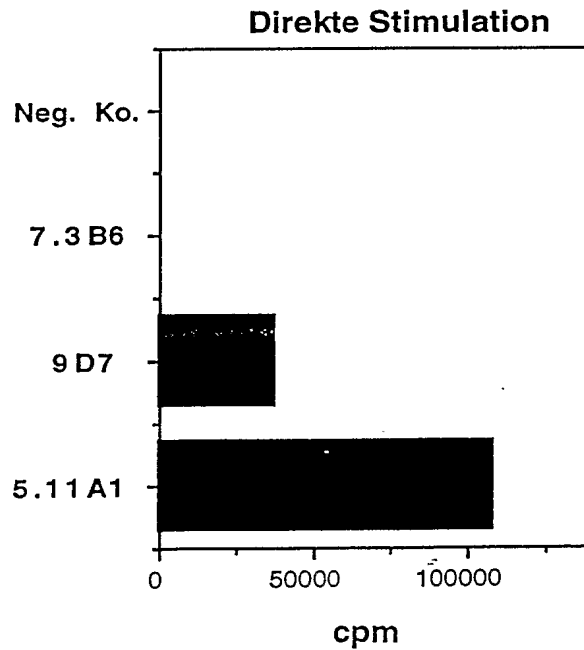
r/m CD28
1-37m/r CD28
1-66m CD28
A64V,
E65Gm CD28
S62P,
A64V, E65G

4/31
FIG. 4

a



b



c

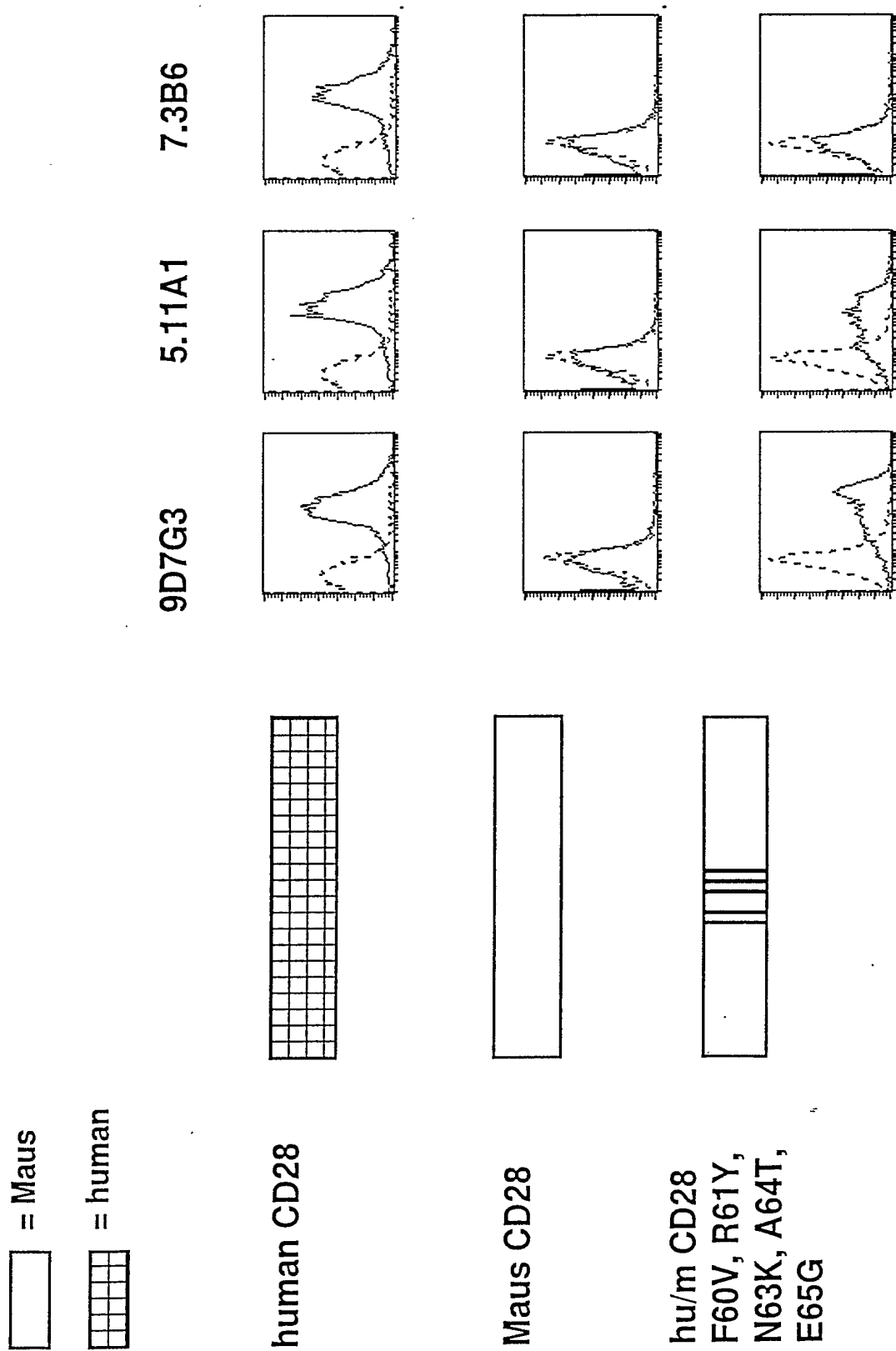


Fig. 5

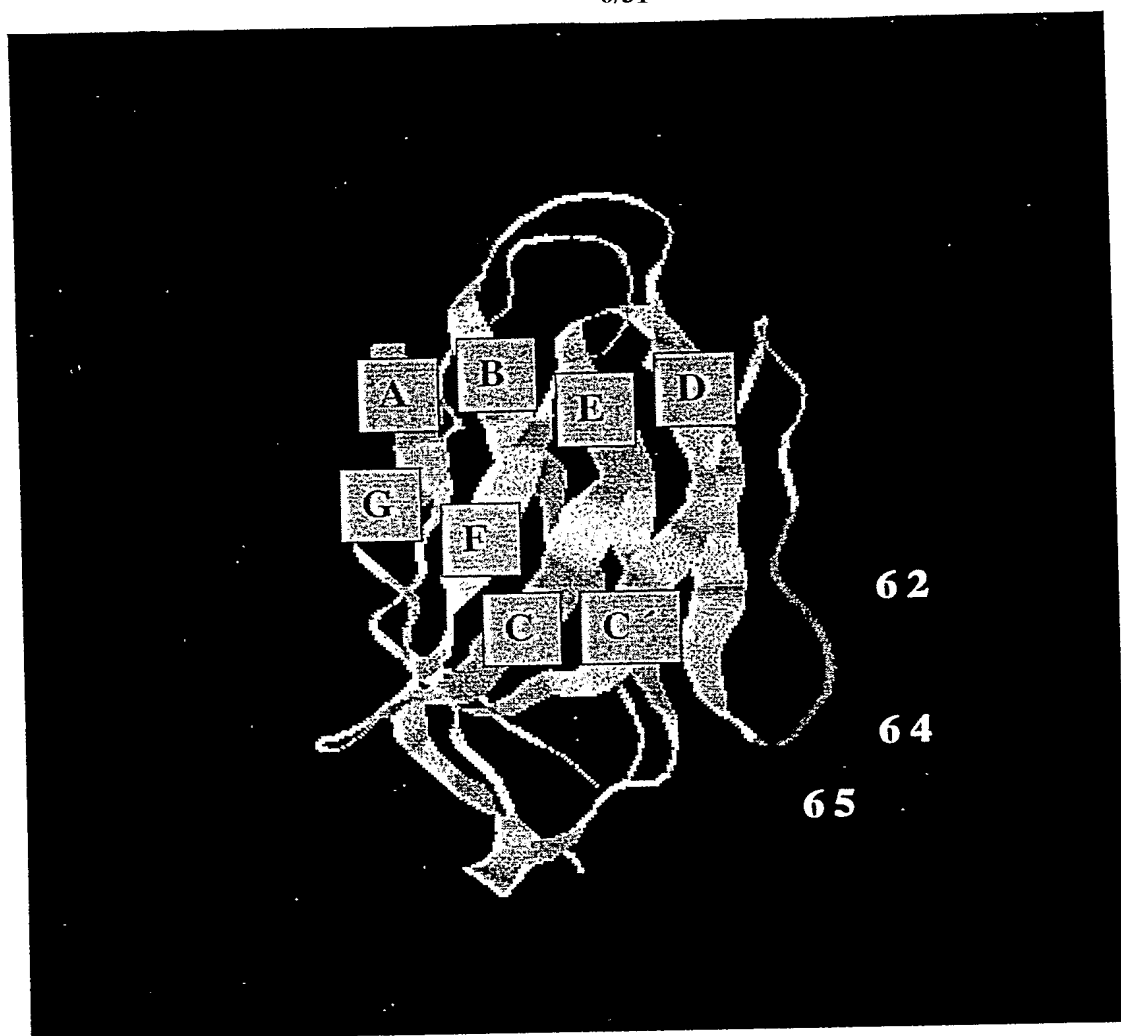
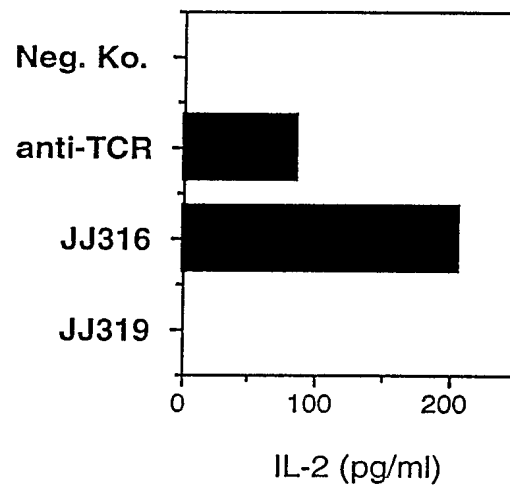
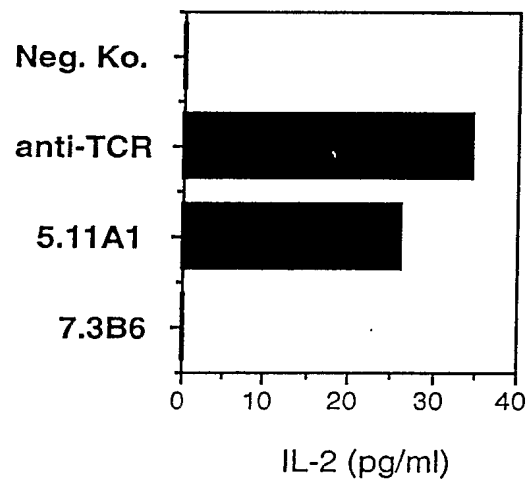


FIG. 6

FIG. 7



a



b

FIG. 8

1 50
GATATCCAGA CGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA
51 100
CAGAGTCACC ATCAGTTGCA GGGCAGGTCA GGACATTAGT AATTATTTAA
101 150
ACTGGTATCA GCAGAAACCA GATGGAAGT TTAAGCTCCT GATCTACTAC
151 200
ACATCAAGAT TACACTCAGG AGTCCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC
201 250
TGGAACAGAT TATTCTCTCA CCATTAGCAA CCTGGAGCAA GAAGATATTG
251 300
CCACTTACTT TTGCCAACAG GGTACATACG TTCCGTGGAC GTTCGGTGGA
301 321
GGCACCAAGC TGGAAATCAA A

a

1 50
DIQTTQTTSS LSASLGDRVT ISCRAGQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
51 100
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GHTLPWTFGG
101 107
GTKLEIK

b

FIG. 8

```
1                                     50
GATGTGCAGC TTCAGGAGTC GGGACCTGGC CTGGTGAAAC CTTCTCAGTC

51                                     100
TCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCACTGGCTA CTCAATCACC AGTGATTATG

101                                    150
CCTGGAACCTG GATCCGGCAG TTTCCAGGAA ACAAACCTGGA GTGGATGGGC

151                                    200
TACATAAGAT ACAGTGGTAG TACTAGCTAC AATCCATCTC TCAAAAGTCG

201                                    250
AATCTCTATC ACTCGAGACA CATCCAAGAA CCAGTTCTTC CTGCAGTTGA

251                                    300
ATTCTGTGAC TACTGAGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC AAGAGATTGG

301                                    350
CCGCGACCGA GCTACTGGTA CTTCGATGTC TGGGGCGCAG GGACCACGGT

351          363
CACCGTCTCC TCA
```

C

```
1                                     50
DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG

51                                     100
YIRYSGSTSY NPSLKSRI SI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYŸCARDW

101          121
PRPSYWYFDV WGAGTTVTVS S
```

d

FIG. 8

1 50
CAGGTCCAAC TGCAGCAGTC CGGACCTGAG CTGGTGAAGC CGGGGACTTC
51 100
AGTGAGGATT TCCTGCGAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACA AGCTACTATA
101 150
TACACTGGGT GAAACAGAGG CCTGGACAGG GACTTGAGTG GATTGGATGT
151 200
ATTTATCCTG GAAATGTCAA TACTAACTAT AATGAGAAGT TCAAGGACAA
201 250
GGCCACACTG ATTGTAGACA CATCCTCCAA CACTGCCTAC ATGCAGCTCA
251 300
GCAGAATGAC CTCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTAC AAGATCACAC
301 350
TACGGCCTCG ACTGGAAGTT CGATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC
351 360
CGTCTCCTCA

e

1 50
QVQLQQSGPE LVKPGTSVRI SCEASGYTFT SYYIHWVKQR PGQGLEWIGC
51 100
IYPGNVNTNY NEKFKDKATL IVDTSNTAY MQLSRMTSED SAVYFCTRSH
101 120
YGLDWNFDVW GAGTTVTVSS

f

FIG. 8

1 50
GACATCCAGA TGAACCAGTC TCCATCCAGT CTGTCTGCAT CCCTTGGAGA
51 100
CACAATTACC ATCACTTGCC ATGCCAGTCA AACATTTAT GTTTGGTTAA
101 150
ACTGGTACCA GCAGAAACCA GGAAATATTC CTAAACTCTT GATCTATAAG
151 200
GCTTCCAACC TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTTAGTG GCAGTGGATC
201 250
TGGAACAGGC TTCACATTAA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG
251 300
CCACTTACTA CTGTCAACAG GGTCAAACCT ATCCGTACAC GTTCGGAGGG
301 321
GGGACCAAGC TGGAAATAAA A

g

1 50
DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ITCHASQNIY VWLNWYQQKP GNIPKLLIYK
51 100
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQTYPYTFGG
101 107
GTKLEIK

h

FIG. 8

```

1                                     15
D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

16                                     30
G   D   R   V   T   I   T   C   H   A   S   Q   N   I   Y
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr

31                                     45
V   W   L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K
Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

46                                     60
L   L   I   Y   K   A   S   N   L   H   T   G   V   P   S
Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser

61                                     75
R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

76                                     90
S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

91                                     105
G   Q   T   Y   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   V   E
Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

106 107
I   K
Ile Lys

```

FIG. 8

1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	15
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	
16	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	30
	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
31	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	45
	Ser	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
46	E	W	I	G	C	I	W	P	G	N	V	N	T	N	Y	60
	Glu	Trp	Ile	Gly	Cys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Tyr	
61	N	E	K	F	K	D	R	A	T	L	T	V	D	T	S	75
	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	
76	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	90
	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	
91	T	A	V	Y	F	C	T	R	S	H	Y	G	L	D	W	105
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Gly	Leu	Asp	Trp	
106	N	F	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	120
	Asn	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	

j

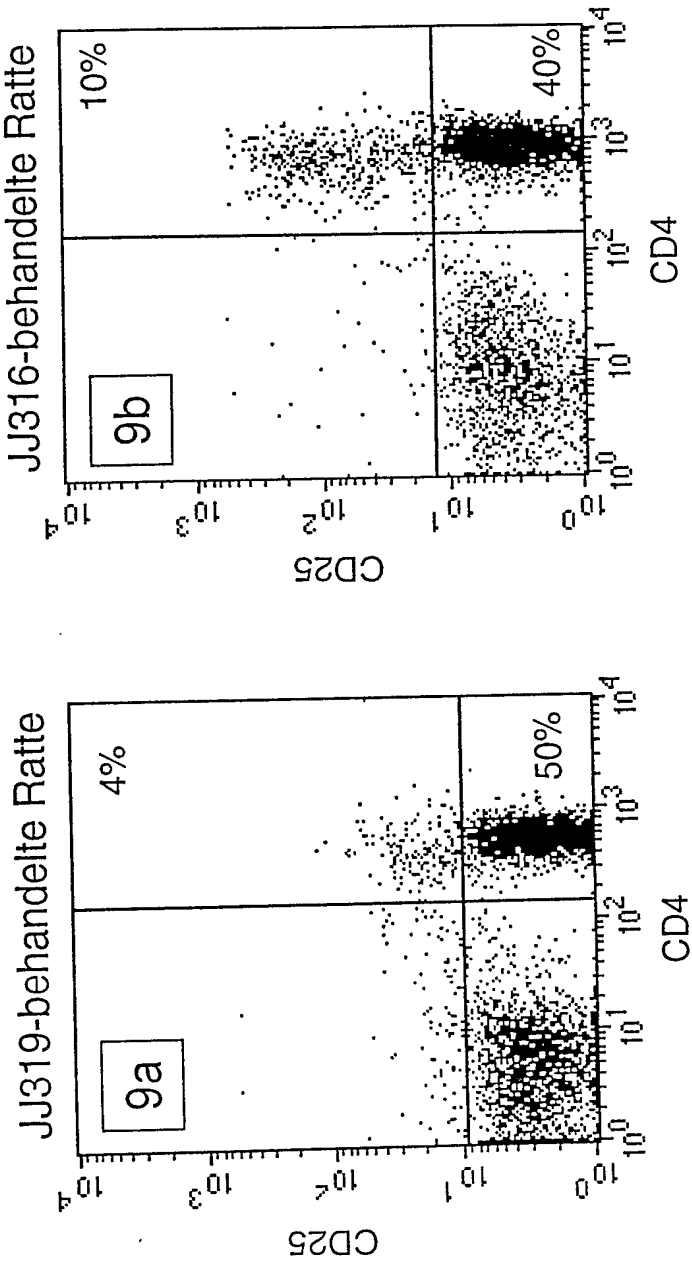


FIG. 9

JJ316-behandeltes Tier

unbehandeltes Tier

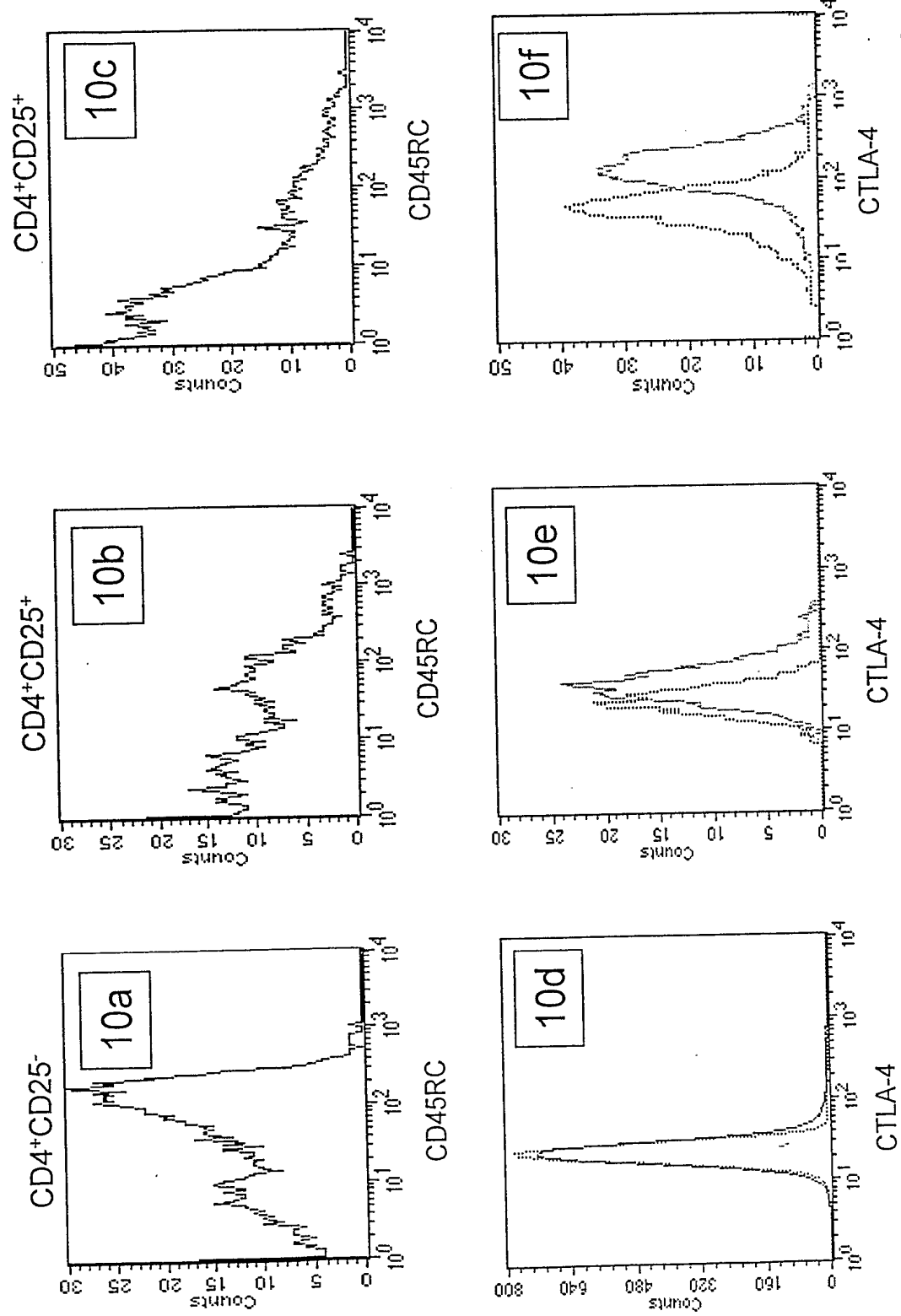


FIG. 10

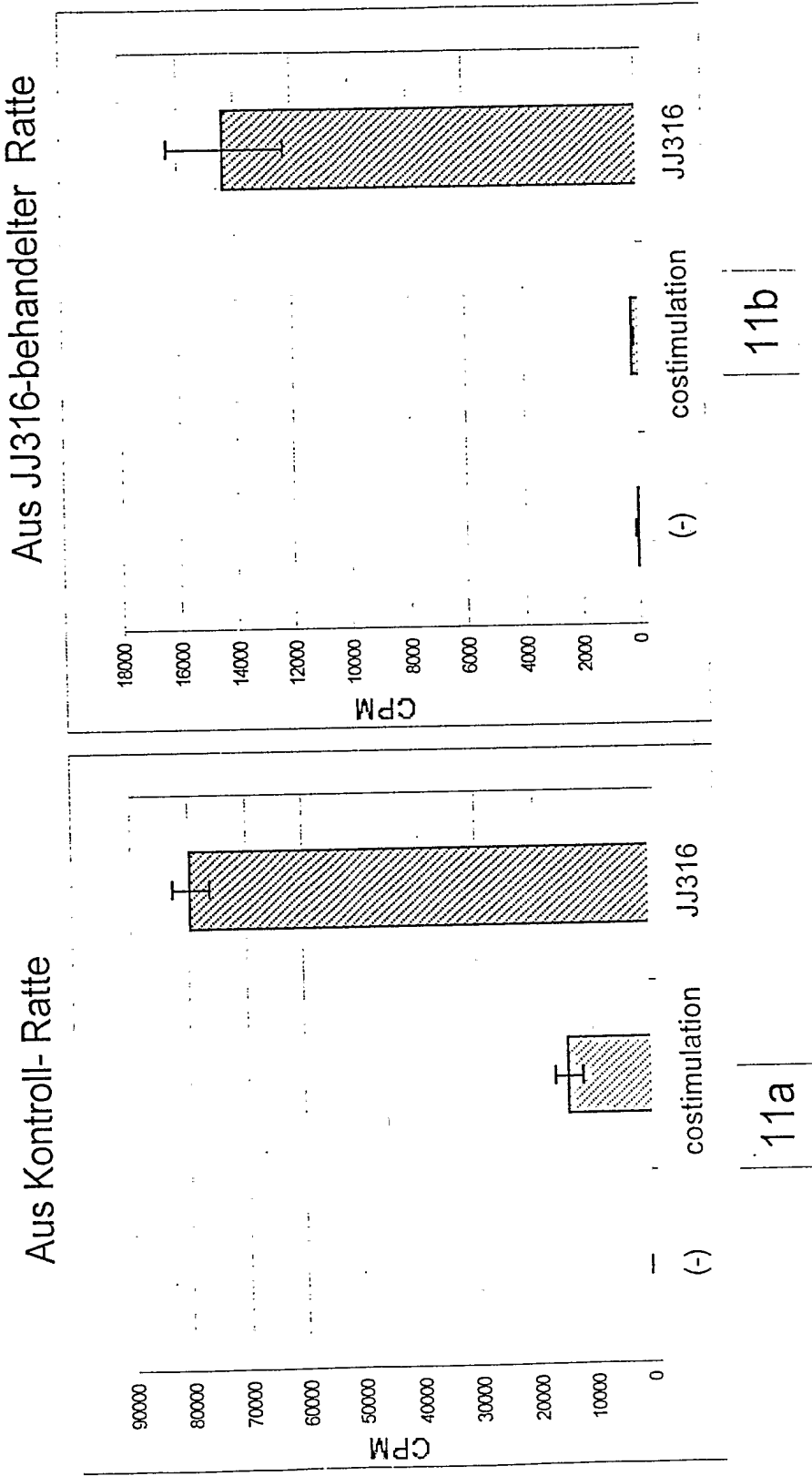


FIG. 11

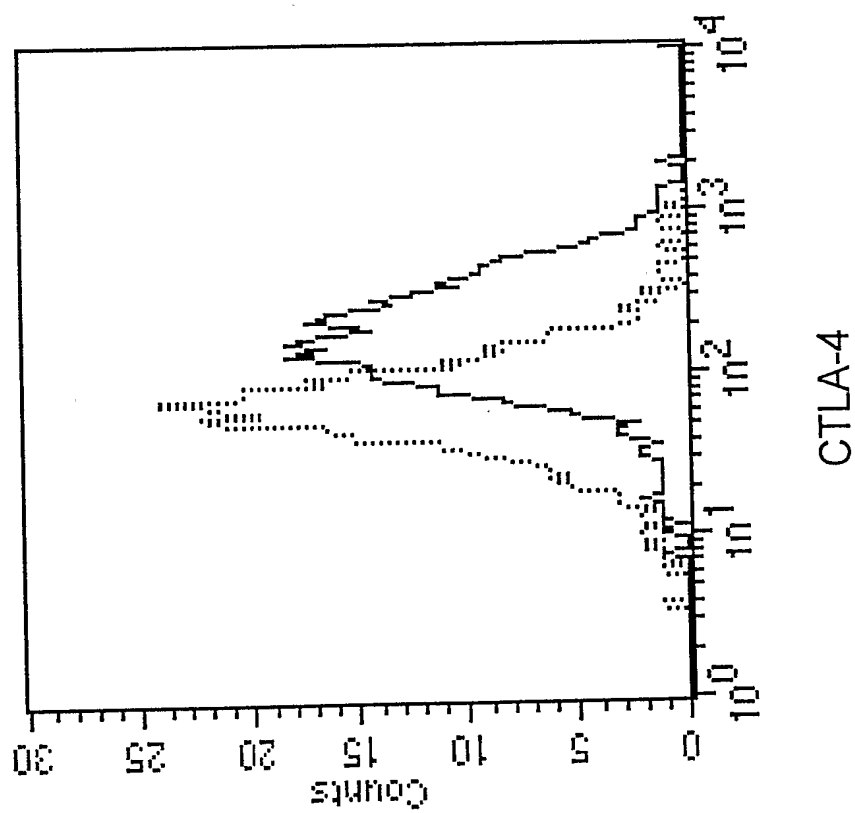


FIG. 12

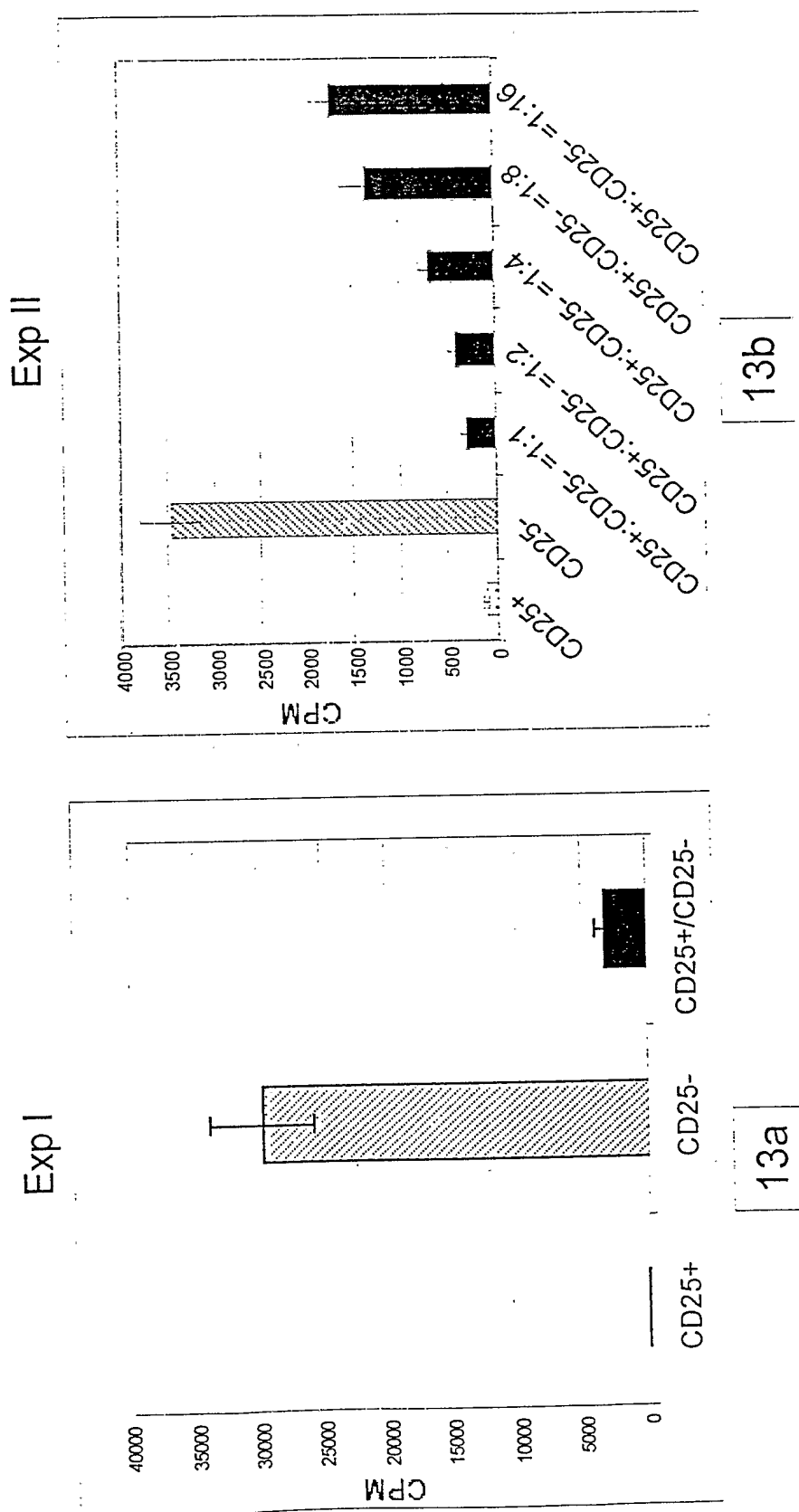
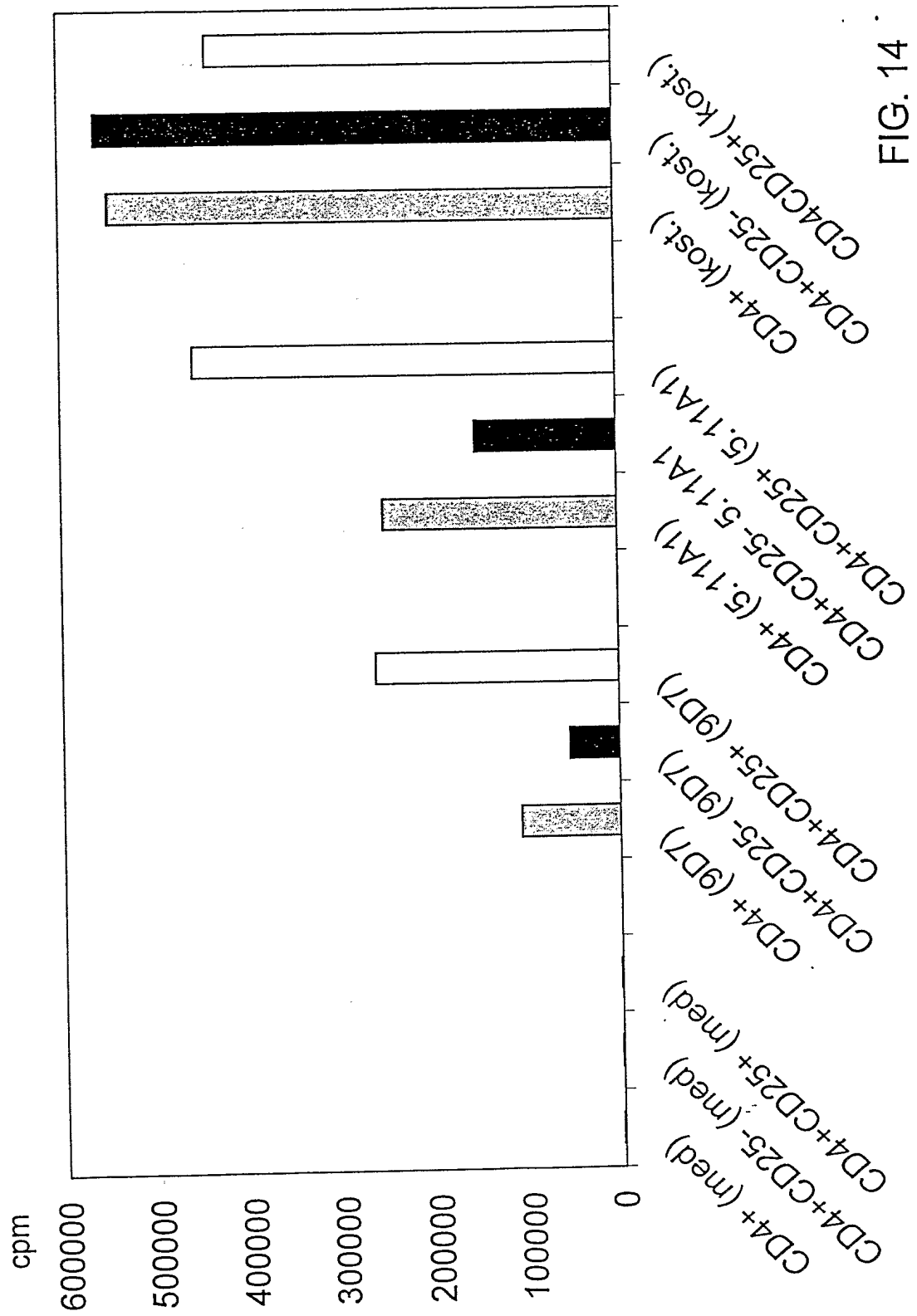
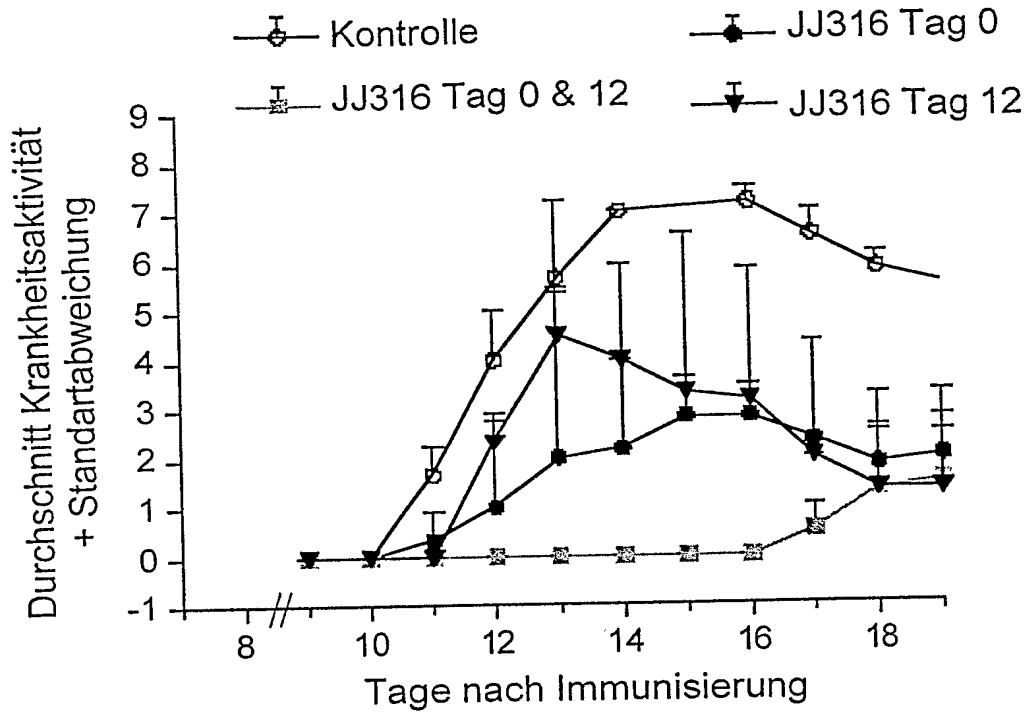


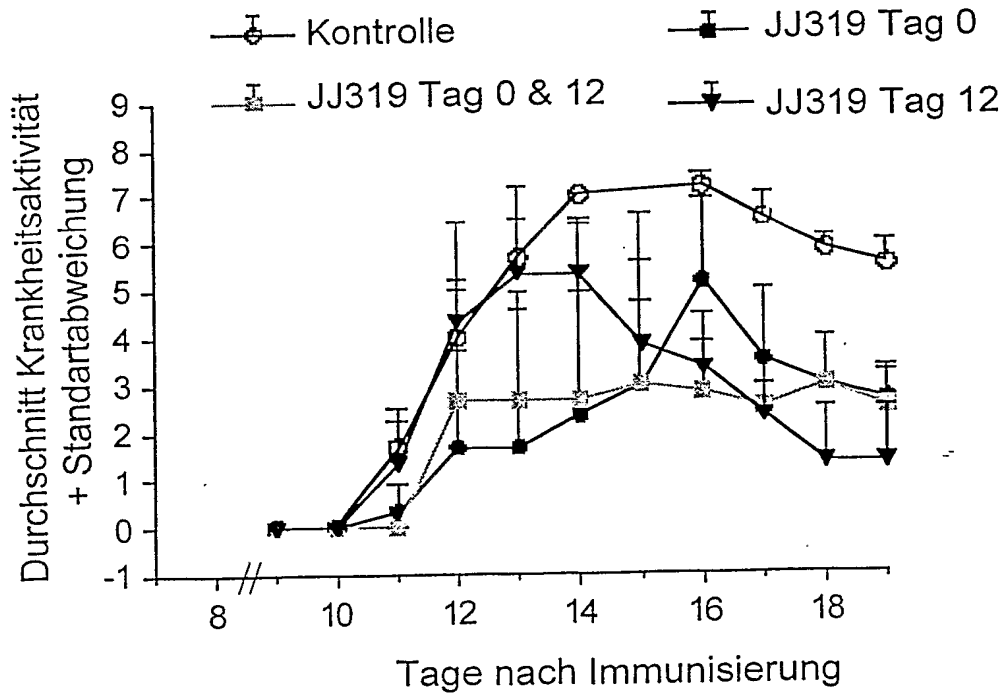
FIG. 13

FIG. 14





a



b

FIG. 16

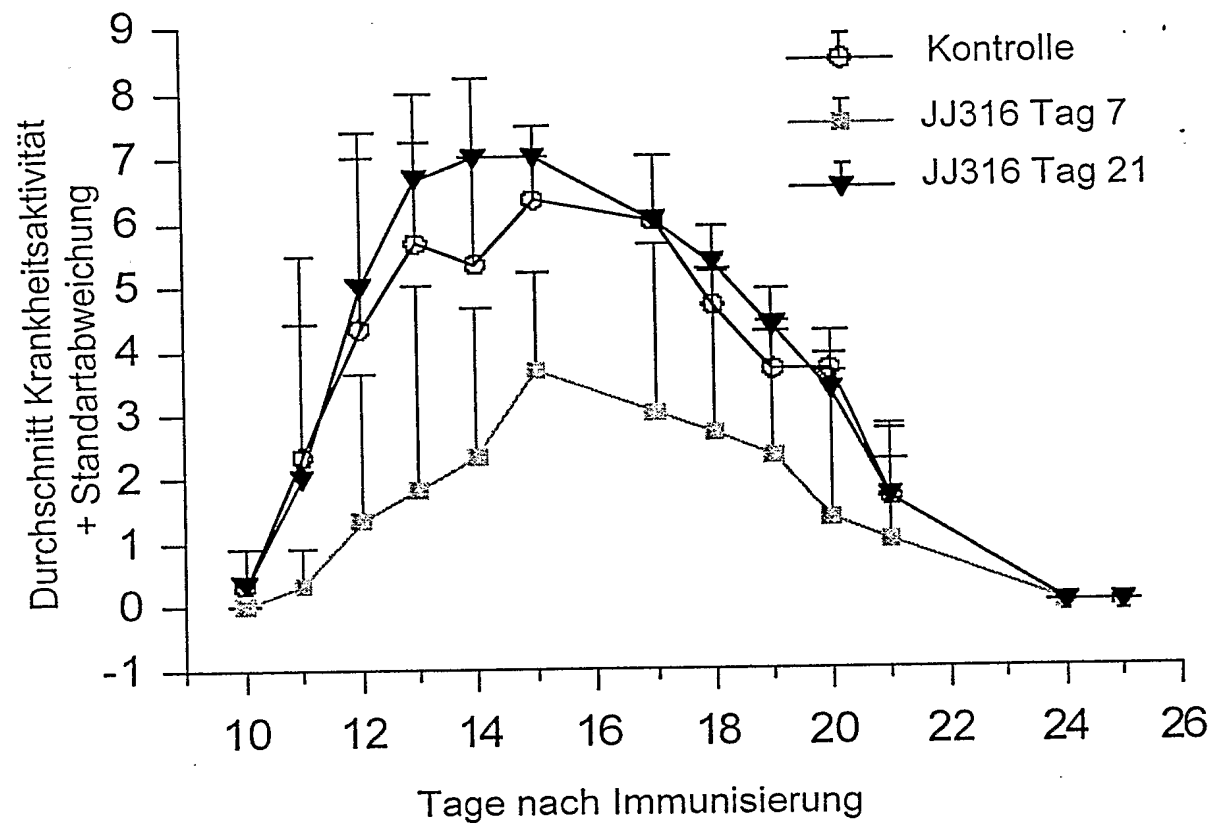
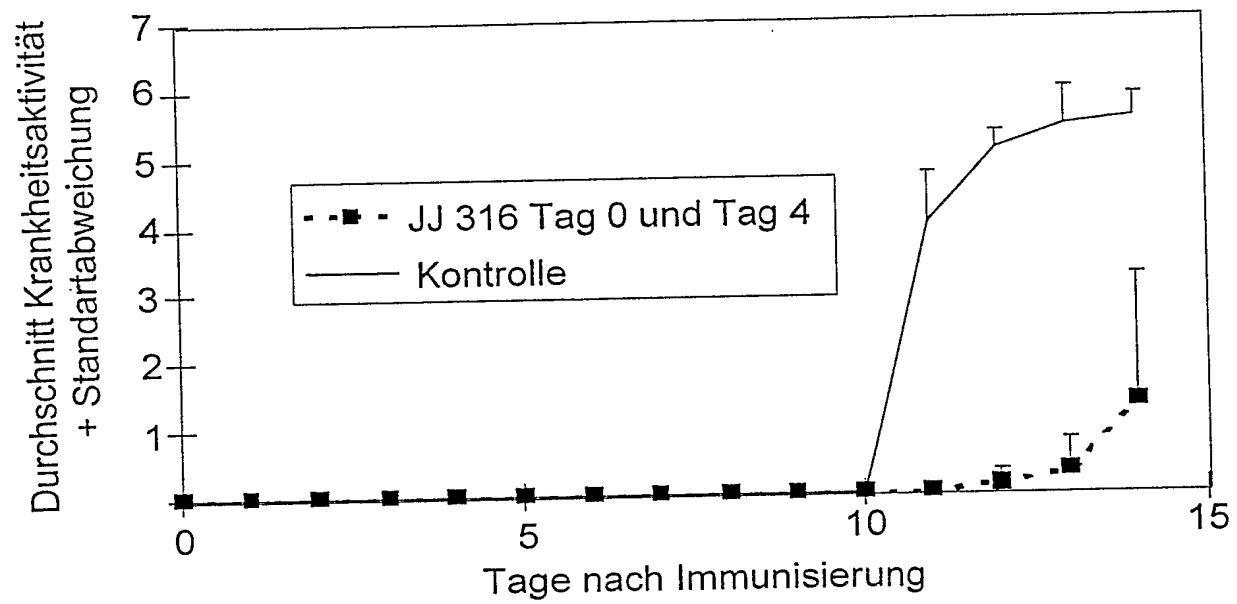


FIG. 17



a

FIG. 17

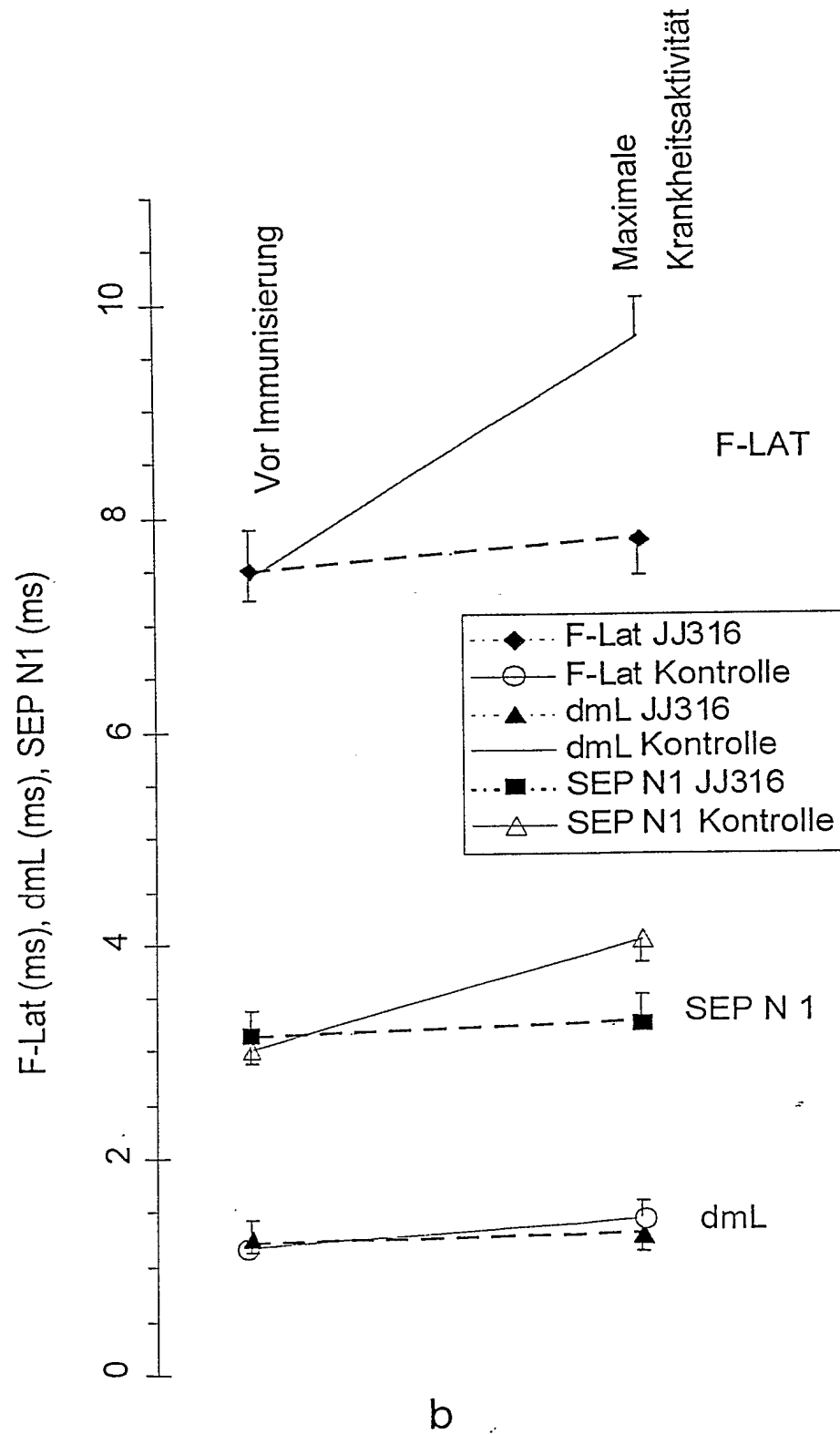
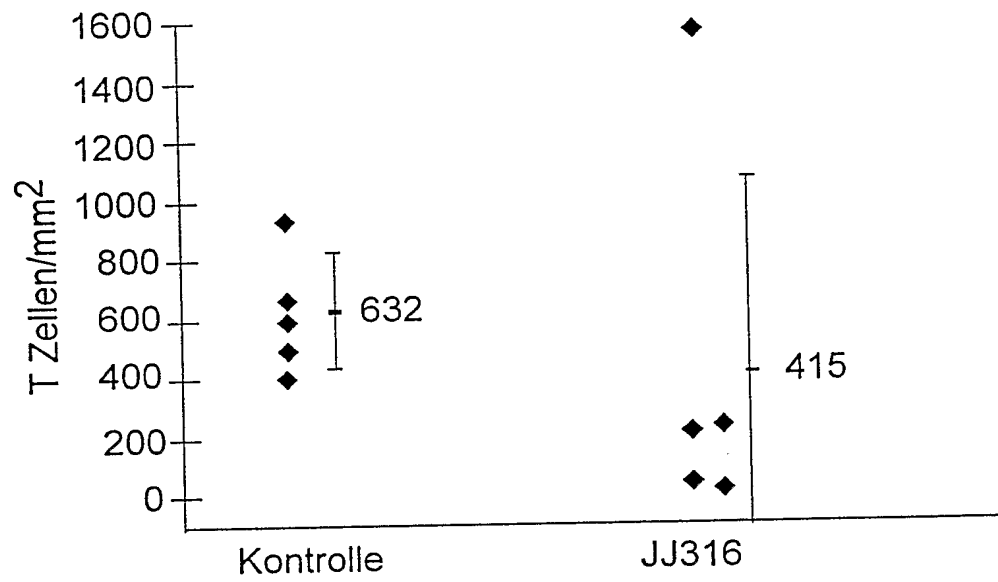


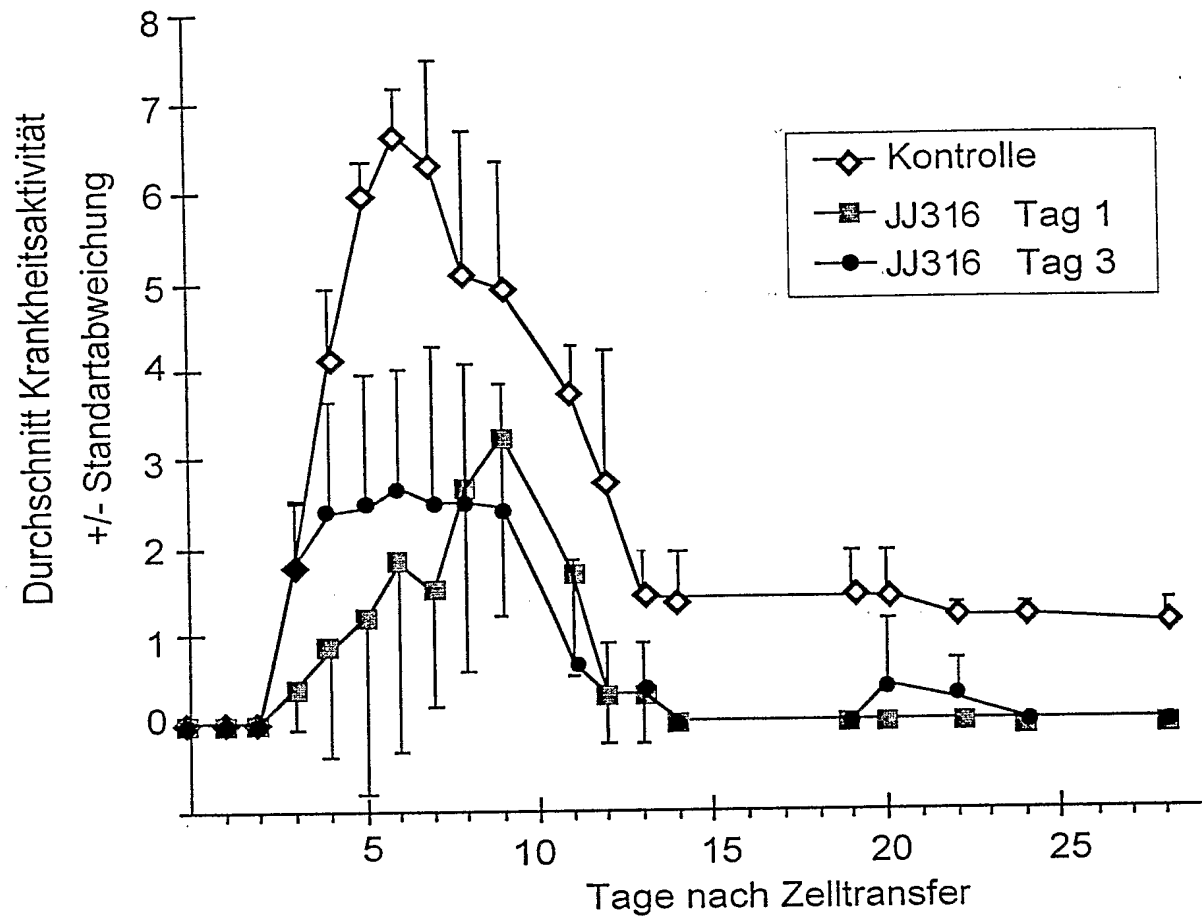
FIG. 17



C

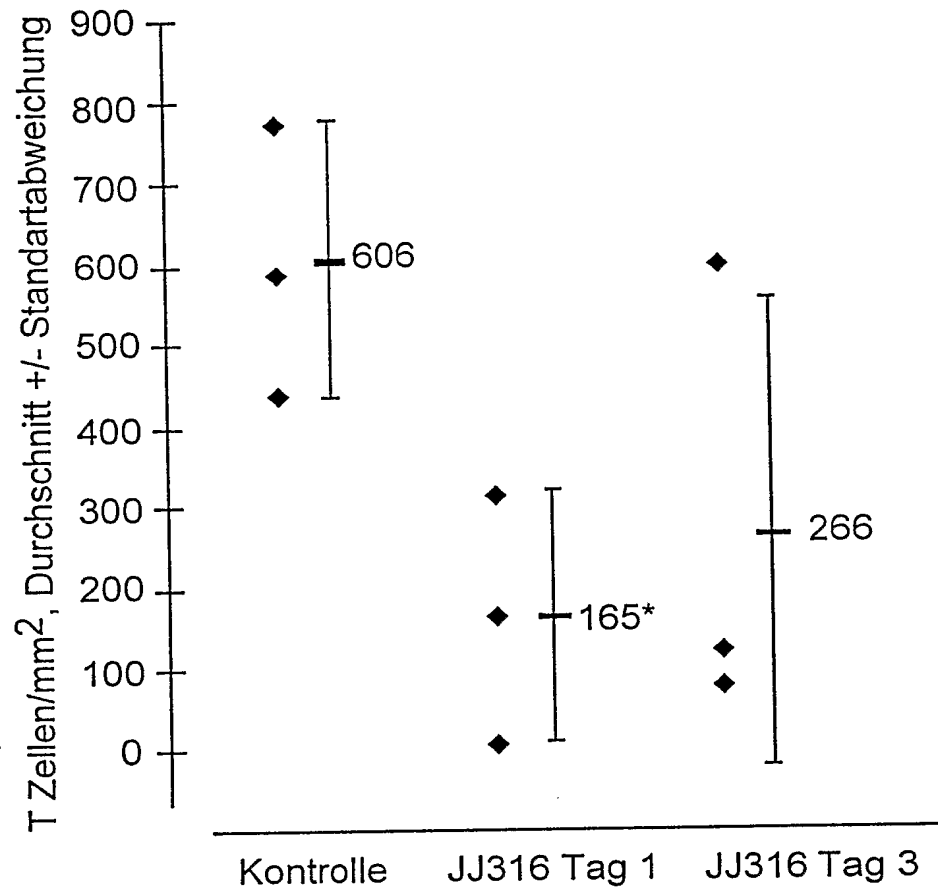
FIG. 18

25/31



Tag 0 bis Tag 6: n=6
von: Tag 7: n=3

a

FIG. 18^{26/31}

*p < 0.05 JJ316 Tag 1 gegenüber Kontrolle

b

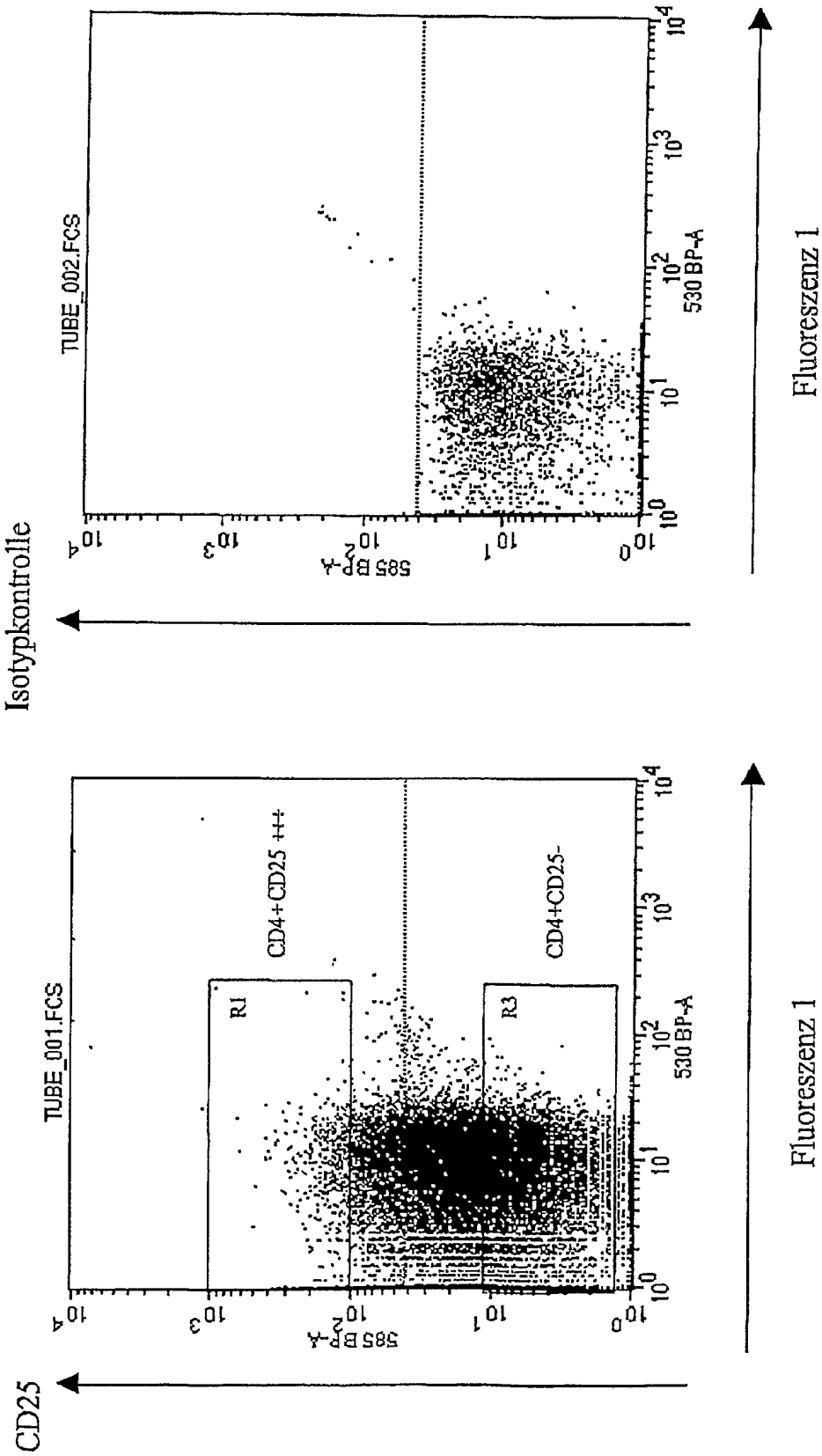


Abb.19

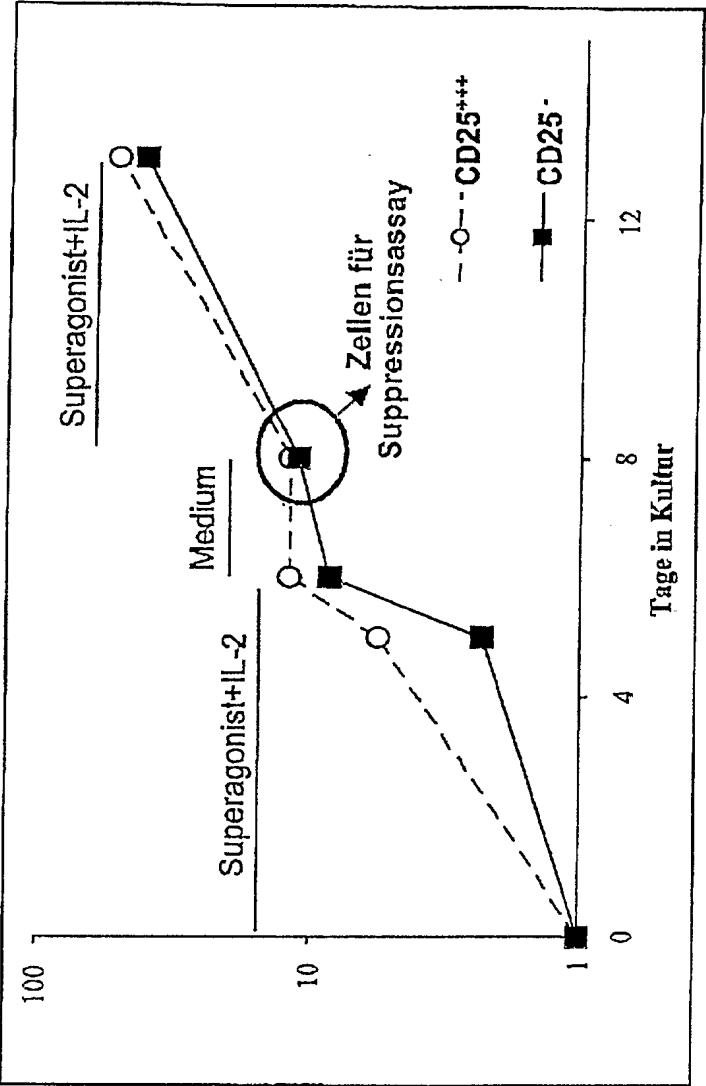


Abb. 20

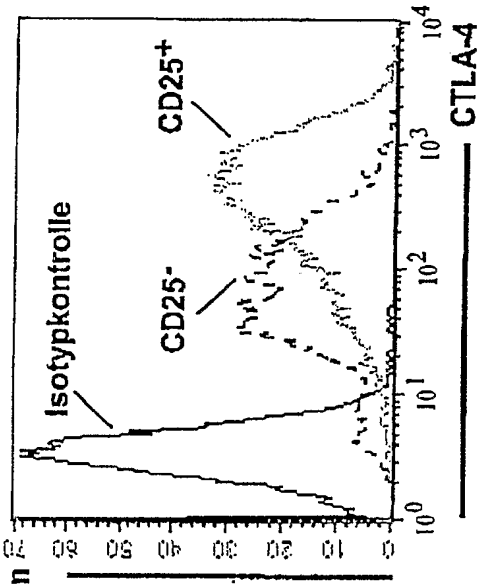
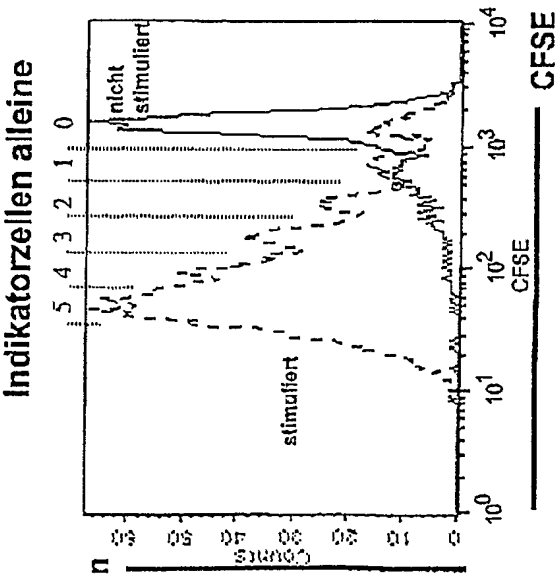


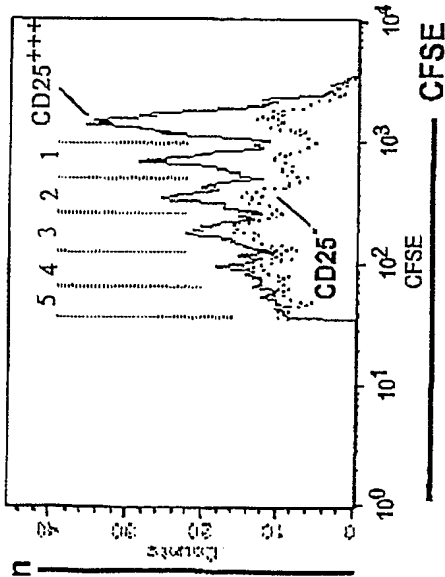
Abb. 21



Teilungen	Stimuliert	Nicht stimuliert
0	5,90%	70,60%
1	6,00%	13,30%
2	9,00%	9%
3	16,00%	4,60%
4	21,90%	2,10%
5	29,10%	0,70%

Abb. 22a

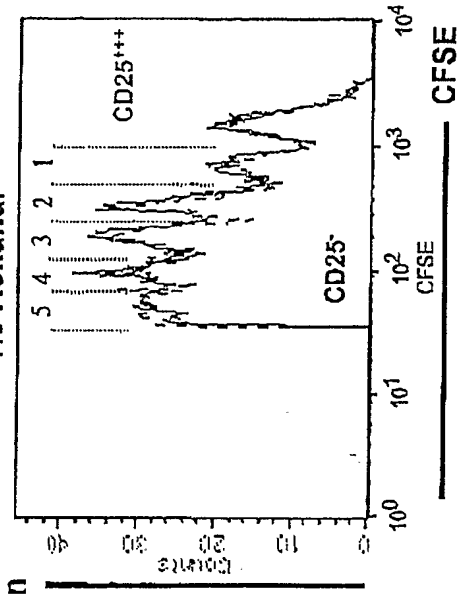
1:1 Kokultur



Teilungen	CD25+++	CD25-
0	28,90%	18,60%
1	17,20%	14,00%
2	17,70%	19,20%
3	17,40%	23,10%
4	13,30%	17,40%
5	6,30%	9,00%

Kolmogorov-Smirnov-Statistik mit Programm
Cell Quest: $p < 0,001$
Mann-Whitney-U-Test (einseitig):
 $p < 0,00115741$

1:5 Kokultur



Teilungen	CD25+++	CD25-
0	13,80%	14,30%
1	12,00%	12,10%
2	17,60%	16,60%
3	23,10%	22,60%
4	21,80%	22,30%
5	12,80%	13,30%

Kolmogorov-Smirnov-Statistik mit Programm
Cell Quest: $p > 0,1$
Mann-Whitney-U-Test (einseitig):
 $p = 0,330986$

SEQUENCE LISTING

<110> TeGenero GmbH

<120> Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung

<130> UNW/DE/0101

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Val Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 2

Tyr Ser Lys Thr
1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 3

Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 4

Val Tyr Ser Lys Thr
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 5

Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 6

Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 7

Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 8

Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln
1 5

<210> 9
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 9

gatatccaga cgacacagac tacatcctcc cgttctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaggtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaagctcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtcatacgc ttccgtggac gttcggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 10

Asp Ile Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gly Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 11

gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
 acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120

```

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagat acagtggtag tactagctac 180
aatccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagattgg 300
ccgcgaccga gctactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

```

```

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

```

```

<400> 12

```

```

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1           5           10           15

```

```

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20           25           30

```

```

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35           40           45

```

```

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50           55           60

```

```

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65           70           75           80

```

```

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85           90           95

```

```

Ala Arg Asp Trp Pro Arg Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100           105           110

```

```

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115           120

```

```

<210> 13
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

```

<400> 13
 caggtccaac tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc cggggacttc agtgaggatt 60
 tcctgcgagg cttctggcta caccttcaca agctactata tacactgggt gaaacagagg 120
 cctggacagg gacttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
 aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg attgtagaca catcctccaa cactgcctac 240
 atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtac aagatcacac 300
 tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggcgcagga ccacggtcac cgtctctca 360

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15

```

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtc aaacatttat gtttggttaa actggtacca gcagaaacca      120
ggaaatatcc ctaaactctt gatctataag gcttccaacc tgcacacagg cgtcccatca      180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggc ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa a                                           321

```

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 16

```

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 17

Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Thr	Gly	Phe
1				5					10					15

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 18

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Tyr	Val	Trp
			20					25					30		

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Thr	Tyr	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
								100	105	

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 19

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1					5				10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20					25					30						
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
35					40					45						
Gly	Cys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
50					55					60						
Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
85					90					95						
Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Gly	Leu	Asp	Trp	Asn	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	
100					105					110						
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
115					120											